

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE),
CARITAS KRANKENHAUS ST. JOSEF
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN**

**DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

UNTERSUCHUNGEN DER INHIBITION DER ZELLPROLIFERATION VON
HER2 ÜBEREXPRIMIERENDEN MAMMAKARZINOMZELLEN UNTER DEM
EINFLUSS TUMORTHERAPEUTISCH WIRKSAMER ANTIKÖRPER,
KINASEINHIBITOREN UND WACHSTUMSFAKTOREN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Breindl

2012

**AUS DEM LEHRSTUHL FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
(SCHWERPUNKT FRAUENHEILKUNDE),
CARITAS KRANKENHAUS ST. JOSEF
PROF. DR. MED. OLAF ORTMANN**

**DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

UNTERSUCHUNGEN DER INHIBITION DER ZELLPROLIFERATION VON
HER2 ÜBEREXPRIMIERENDEN MAMMAKARZINOMZELLEN UNTER DEM
EINFLUSS TUMORTHERAPEUTISCH WIRKSAMER ANTIKÖRPER,
KINASEINHIBITOREN UND WACHSTUMSFAKTOREN

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Stefanie Breindl

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff
2. Berichterstatter	PD Dr. Petra Rümmele
Tag der mündlichen Prüfung:	03.04.2013

1	EINLEITUNG	1
1.1	DIE ERBB-REZEPTORFAMILIE	1
1.1.1	Die einzelnen Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie	1
1.1.2	Die Liganden und Rezeptoraktivierung der ErbB-Familie	2
1.1.3	Die Signaltransduktion durch ErbB-Rezeptoren	4
1.1.4	Von der Normalfunktion zur Tumorentstehung	5
1.2	DAS MAMMAKARZINOM	6
1.2.1	Klinische Eckdaten	6
1.2.2	Das Her2/neu überexprimierende Mammakarzinom	7
1.3	DER C-ERBB2 ALS <i>TARGET</i> IN DER MAMMAKARZINOMTHERAPIE	9
1.3.1	Der monoklonale Antikörper Trastuzumab in Forschung und Klinik	9
1.3.2	Der monoklonale Antikörper Pertuzumab in Forschung und Klinik	11
1.3.3	Der duale c-erbB1/c-erbB2 Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib in Forschung und Klinik	11
1.4	ZIELSETZUNG	13
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	15
2.1	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE FLUORESZENZANALYTIK	15
2.1.1	Das Durchflusszytometer FACSCanto II	16
2.1.2	Das Durchflusszytometer LSR II	18
2.1.3	Verwendete Farbstoffe	19
2.1.4	Datendarstellung und -verarbeitung	19
2.2	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLZYKLUSANALYSE	20
2.2.1	Der Zellzyklus	20
2.2.2	Die BrdU/Hoechst- <i>Quenching</i> Technik	21
2.3	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG APOPTOTISCHER ZELLEN	23
2.3.1	Die Apoptose	23
2.3.2	Die Annexin-V-FITC Messungen	24
3	MATERIAL	26
3.1	UNTERSUCHTE ZELLINIEN	26
3.2	MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR	27
3.3	ANTIKÖRPER UND TYROSINKINASEINHIBITOREN	27
3.3.1	Primäre Antikörper	27
3.3.2	Sekundäre Antikörper	28

3.3.3	Tyrosinkinaseinhibitoren	28
3.4	DNA-FARBSTOFFE, ENZYME UND WACHSTUMSFAKTOREN	28
3.4.1	DNA-Farbstoffe	28
3.4.2	Enzyme	28
3.4.3	Wachstumsfaktoren	28
3.5	GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN (<i>KITS</i>)	28
3.6	REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN	29
3.7	PUFFER UND LÖSUNGEN	30
3.8	VERBRAUCHSMATERIAL	31
3.9	GERÄTE	32
4	METHODEN	34
4.1	METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG UND -PRÄPARATION	34
4.1.1	Standardkultur	34
4.1.2	Zellkultur und –präparation für die BrdU/Hoechst- <i>Quenching</i> Messungen	35
4.1.3	Zellkultur und -präparation für die Reversibilitätsmessungen von Lapatinib	36
4.1.4	Zellkultur und –präparation für die Annexin-V-FITC Messungen	37
4.1.5	Zellkultur und –präparation für die Gewinnung von denaturierten Proteinlysaten	38
4.2	PROTEINCHEMISCHE/ IMMUNOLOGISCHE METHODEN	39
4.2.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit	39
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>SDS-Page</i>) und Western Blot	39
4.2.3	<i>Proteome Profiler™</i> Array zur Detektion von phosphorylierten Proteinen	41
5	ERGEBNISSE	43
5.1	BRDU/HOECHST- <i>QUENCHING</i> MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER WACHSTUMSFAKTOR-SPEZIFISCHEN KOMPENSATION VON ANTI-HER2-BEHANDLUNGEN	43
5.2	DIE REVERSIBILITÄT DER DURCH LAPATINIB INDUZIERTEN ZELLINHIBITION BEI BT474 UND SK-BR-3	47
5.2.1	Vergleichende Betrachtung von Zellinhibition und Erholungspotential bei BT474 und SK-BR-3 Zellen gegenüber 100 nM Lapatinib	47
5.2.2	Vergleichende Betrachtung von Zellinhibition und Erholungspotential bei BT474 und SK-BR-3 Zellen gegenüber 10 nM Lapatinib	49
5.3	ANNEXIN-V-FITC MESSUNGEN ZUR APOPTOSEBESTIMMUNG BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN	50

5.4	<i>SDS-PAGE</i> UND WESTERN BLOT UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG WICHTIGER REZEPTOR- UND SIGNALPROTEINE BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN	53
5.5	<i>CELL SIGNALING</i> ANALYSEN MITTELS PHOSPHO-KINASE-ANTIKÖRPER-ARRAY BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN	57
6	DISKUSSION	63
6.1	DER EINFLUSS VON WACHSTUMSFAKTOREN AUF DIE TUMORTHERAPIE MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB	63
6.2	DIE REVERSIBILITÄT DER DURCH LAPATINIB INDUZIERTEN ZELLINHIBITION	67
6.3	DIE INDUKTION DER APOPTOSE DURCH BEHANDLUNGEN MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB	69
6.4	DIE PHOSPHORYLIERUNG WICHTIGER REZEPTOR- UND SIGNALPROTEINE BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN	71
	6.4.1 Die EGF- und c-erbB2-Rezeptorphosphorylierung	71
	6.4.2 Die Phosphorylierung der Signalproteine AKT und ERK1/2	73
6.5	ANALYSEN ZUM <i>CELL SIGNALING</i> BEI BEHANDLUNGEN MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB	74
	6.5.1 Die Inhibition von Signalmolekülen unter verschiedenen Anti-Her2-Therapien bei BT474 und SK-BR-3	74
	6.5.2 Zusammenfassende Betrachtung der Inhibition von Signalmolekülen bei beiden Zelllinien	77
7	ZUSAMMENFASSUNG	78
8	AUSBLICK	82
9	LITERATURVERZEICHNIS	83

1 EINLEITUNG

1.1 DIE ERBB-REZEPTORFAMILIE

1.1.1 Die einzelnen Vertreter der ErbB-Rezeptorfamilie

Insgesamt 20 verschiedene Rezeptorfamilien, einschließlich der Gruppe der ErbB-Rezeptoren, gehören zur Klasse der Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und fungieren als wichtige Regulatoren von intrazellulären Prozessen wie der Proliferation, dem Zellwachstum und -überleben sowie der Differenzierung und dem Metabolismus. Diese große Proteinfamilie schließt den Insulinrezeptor und Rezeptoren für Wachstumsfaktoren mit ein, wie z.B. den EGFR (*epidermal growth factor receptor*), FGFR (*fibroblast growth factor receptor*) und den VEGFR (*vascular epithelial growth factor receptor*), um nur einige von ihnen zu nennen. In Abwesenheit von Liganden liegen sie mit Ausnahme des aus zwei Ketten bestehenden Insulinrezeptors in monomerischer Konfiguration als transmembranöse Glykoproteine in der Zelle vor (1). Die meisten RTK können Familien mit homologen Rezeptoreigenschaften und interaktiven Funktionen zugeordnet werden (2). So vermutet man auch den genomischen Ursprung aller vier ErbB Vertreter im EGFR (3). Er konnte als einziger der vier homologen Vertreter auch bei Wirbellosen nachgewiesen werden und hat wahrscheinlich durch Gen- und Signaldiversifizierung das komplexe Netzwerk aus insgesamt vier Rezeptoren und über zehn Liganden entstehen lassen (2;4). Die ErbB-Rezeptoren zeigen ein starkes Expressionsmuster auf epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Zellen und nehmen eine Schlüsselrolle in der Embryo- und Organogenese, der Gewebshomöostase und der Kommunikation zwischen Intra- und Extrazellulärraum ein (5;6). Der hohe Grad an Konservierung äußert sich auch im nahezu einheitlichen Aufbau aller vier Mitglieder: Auch bekannt als Rezeptor-Tyrosinkinasen-Typ 1 exponieren sie eine Ligandenbindungsdomäne auf der Zelloberfläche und sind über eine einzelne hydrophobe Transmembrandomäne mit der intrazellulären Tyrosinkinase und deren Phosphorylierungsstellen variabler Länge verbunden. Die Nomenklatur der vier Subtypen erfolgt in Anlehnung an die strukturelle Verwandtschaft des EGF-Rezeptors mit dem viralen Onkogen *v-erbB* des *avian erythroblastosis virus* als c-erbB1, c-erbB2, c-erbB3 und c-erbB4 und lässt bereits auf das onkogene Potential der Rezeptorfamilie schließen (7). Als Synonyme sind in aufsteigender Reihenfolge weiterhin EGFR und HER1, HER2 bzw. HER2/neu, HER3 und HER4 bekannt (HER: *Human epidermal growth factor related receptor*; Neu: Neuroblastom) (8;9). Nur zwei der insgesamt vier ErbB-Proteine sind funktionell autonom, nämlich der c-erbB4 sowie der EGFR (5). Letzterer stellt das erste bekannte Mitglied der Familie dar und war der erste Rezeptor, in dem eine Liganden-abhängige Kinaseaktivität demonstriert werden konnte (10). Die übrigen beiden Vertreter weisen nennenswerte Besonderheiten auf, die sie nur in Verbindung mit Rezeptorheterodimerisierung und -oligomerisierung zu potenten Vermittlern zellulärer Signaltransduktion machen: Während c-erbB2, der in Zusammenhang mit Rezeptorüberexpression in mehreren Formen menschlicher Karzinome bekannt geworden ist,

keinen bis heute bekannten Liganden besitzt, hat die intrinsische Tyrosinkinase des c-erbB3-Rezeptors aufgrund einer veränderten Proteinsequenz ihre Funktionsfähigkeit eingebüßt und ist isoliert nicht zur Signalübertragung ins Zellinnere im Stande (5;11). Eine interessante Eigenschaft des c-erbB4 Rezeptors stellt sein Vorkommen in verschiedenen Isoformen dar, die durch gewebsspezifische alternative *Splice*vorgänge generiert werden können. Alterationen finden sich einerseits in der juxtamembranösen Domäne und andererseits im zytoplasmatischen Anteil des Rezeptors und ermöglichen insgesamt vier denkbare und funktionstüchtige Rezeptorisoformen. Im ersten Fall variiert die Länge einiger Aminosäuren in der Extrazellulärregion des c-erbB4 und unterliegt in seiner längeren Version dadurch leicht einer proteolytischen Spaltung durch *TACE* (*tumor necrosis factor- α converting enzyme*). Die spaltbare Variante wird im Folgenden als Jma, die kleinere und intakt bleibende als Jmb bezeichnet. Dieses Rezeptor*shedding* erzeugt einen membranständigen 80 kDa schweren Rezeptorrest, der seinerseits wiederum zum Substrat weiterer proteolytischer Spaltung durch eine γ -Secretase wird (12;13). Dieser Prozessierungsvorgang erzeugt einen löslichen intrazellulären Rezeptor, der in den Nukleus transloziert wird und dort als Koaktivator oder Korepressor für verschiedene Transkriptionsfaktoren agieren kann. Als Beispiele seien hier nur der Östrogenrezeptor- α oder STAT5 (14) genannt, die einer Regulation durch c-erbB4 unterliegen. Sequenzveränderungen in der Zytoplasmadomäne des c-erbB4 zum anderen betreffen eine Andockstelle für die Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase (PI3K), die damit sowohl deletiert (CYT2) als auch intakt (CYT1) vorliegen kann (15). Die Tatsache, dass vier verschiedenartige Rezeptorisoformen in Geweben angetroffen werden können, lässt auf essentielle Unterschiede bezüglich ihrer Funktion und Bedeutung schließen. Kürzlich wurden Jma- und Jmb-Isoformen mit überlebensfördernden bzw. -hindernden Stimuli in Verbindung gebracht, bei CYT-Isoformen soll ein Zusammenhang zwischen Proliferation bzw. Differenzierung bestehen (16).

1.1.2 Die Liganden und Rezeptoraktivierung der ErbB-Familie

Für die Familie der ErbB-Rezeptoren sind insgesamt zehn rezeptorspezifische Wachstumsfaktoren bekannt, die allerdings c-erbB2 ausnehmen. EGF (*epidermal growth factor*), Amphiregulin (AR) und TGF- α (*transforming growth factor- α*) binden ausschließlich an den EGFR, Betacellulin (BTC), HB-EGF (*heparin binding EGF-like growth factor*) und Epiregulin (EPR) binden noch zusätzlich an c-erbB4. Die Gruppe der Neureguline (Neu) ist auch unter dem Namen Hereguline (HRG) oder *Neu differentiation factors* (NDF) bekannt und weist je nach Subgruppe unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Rezeptoren auf: NRG 1 und 2 fungieren als Liganden für c-erbB3 und c-erbB4, NRG 3 und 4 aktivieren dagegen ausschließlich c-erbB4. Alle Liganden der ErbB-Familie werden als Transmembranvorstufen produziert, dann prozessiert und durch Proteolyse in das Interstitium freigegeben (17). Sie charakterisieren sich durch mindestens eine EGF-ähnliche Struktur aus drei intramolekularen Disulfidschleifen (4). Im Gegensatz zu EGF, das in vielen Körperflüssigkeiten enthalten ist, ist das Expressionsprofil der meisten ErbB-spezifischen Liganden mehr limitiert und an bestimmte Organe oder Entwicklungsstadien geknüpft. Die meisten Liganden der ErbB-Familie wirken

autokrin oder parakrin über kurze Distanzen im Zellverband und regulieren somit ihre Signaleigenschaften durch Vorkommen und Reichweite (18).

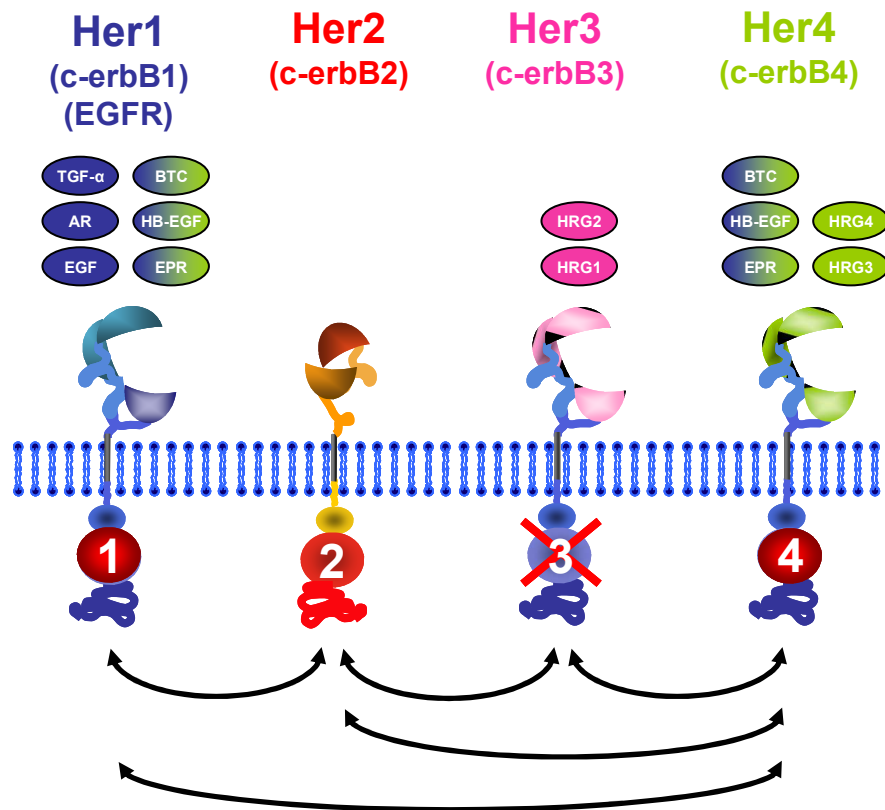


Abbildung 1: Die vier ErbB-Vertreter, ihre spezifischen Liganden und Interaktionen; in Anlehnung an (4)

Das Prinzip der Signaltransduktion der ErbB-Rezeptoren ist in ihrer horizontalen Organisation über der Membranoberfläche begründet und schafft somit die strukturelle Basis für eine laterale Hetero- und Homodimerisierung. Die Extrazellulärregion aller vier Vertreter gliedert sich in zwei Cystein-reiche (II und IV) und zwei Cystein-freie (I und III) Subdomänen, deren Hauptcharakteristikum eine β -Haarschleife an der Subdomäne II darstellt und so Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen vermitteln kann. Daher rührt auch der ihr eigens attribuierte Name als „Dimerisierungsschleife“. Beim prototypischen, monomerisch konfigurierten ErbB-Rezeptor liegt die Dimerisierungsschleife maskiert vor. Sobald jedoch ein Ligand an die Subdomänen I und III des Rezeptors bindet, werden grundlegende Konfigurationsänderungen am Rezeptor vorgenommen, die die Dimerisierungsschleife exponieren und so eine dimerische Rezeptorkonfiguration stabilisieren können. Die beiden Subdomänen II zweier Rezeptoren können so in den jeweiligen Partnerrezeptor interkalieren (5;11;19). Wiederum sei hier der c-erbB2 als Ausnahme erwähnt, dessen Dimerisierungsschleife konstitutiv aktiv ist. Diese Tatsache macht ihn einerseits unfähig zur Ligandenbindung, andererseits aber auch zum attraktiven Dimerisierungspartner für andere ErbB-Rezeptoren. Die Fähigkeiten zur stabilen Komplexbildung, zur Affinitätserhöhung gegenüber dem Liganden, zur intensivierten und prolongierten Signalübertragung und zur lateralen Transaktivierung weiterer ErbB-Moleküle lässt den c-erbB2 in einer klar definierten Hierarchie zum bevorzugten Dimerisierungspartner

der gesamten Rezeptorfamilie werden (20). Die entscheidenden Konfigurationsänderungen in der Ektodomäne der Rezeptoren bringen die jeweils zugehörigen Tyrosinkinasen in eine passende Orientierung zueinander und ermöglichen so die gegenseitige Trans- oder Cross-Phosphorylierung von regulatorischen Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife ihrer aktiven Zentren (5). Eine so gesteigerte Affinität zu ATP führt zu einer vermehrten Bindung von γ -Phosphat an die C-terminale Domäne und an Substrat und erhöht damit die basale enzymatische Aktivität der Tyrosinkinase. Dadurch werden Bindestellen für intrazelluläre Signal- und Adaptermoleküle freigegeben und die Formierung kompetenter Signalkomplexe eingeleitet (21).

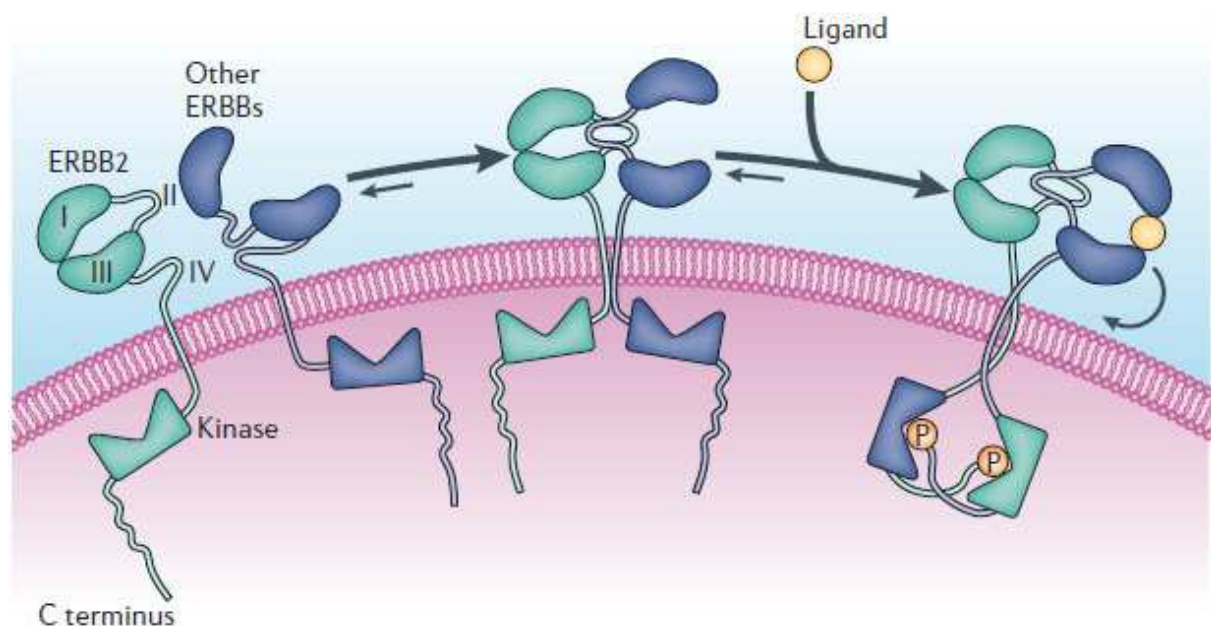


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Liganden-induzierten Heterodimerisierung zwischen c-erbB2 und einem anderen ErbB-Rezeptor, ausgelöst durch Ligandenbindung. Die Dimerisierungsschleifen (II) vermitteln die Rezeptordimerisierung. Somit kann eine gegenseitige Transphosphorylierung der jeweiligen Tyrosinkinasen erfolgen (5).

1.1.3 Die Signaltransduktion durch ErbB-Rezeptoren

Jeder ErbB-Rezeptor spricht auf Grund von Unterschieden in der C-terminalen Region sein eigenes Repertoire an Signalmolekülen an, die ihrerseits wiederum durch die Zusammensetzung des Dimers und die Art und Weise der erfolgten Transphosphorylierung diktiert werden. So wird die Signaltransduktion in den Zellkern und das physiologische Ergebnis vermittelt. Dadurch, dass jeder Rezeptor eigene Präferenzen für eine definierte Subgruppe an Signalmolekülen aufweist, kann eine Vielzahl an Signalwegen durch nur einen einzigen Liganden beschriftet werden (4;6;21). Auf nukleärer Ebene wird so über die Aktivierung oder Repression bestimmter DNA-Abschnitte entschieden. Die *second messenger* Proteine können über SH2 (*Src-homolog-2*)- oder PTB (*phosphotyrosine-binding*)-Domänen rekrutiert werden und die weitere Signaltransduktion induzieren. Zu den bedeutendsten Signalwegen der ErbB-Rezeptorgruppe gehört der Ras-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Weg. Er gibt einen

mitogenen Stimulus ins Zellinnere weiter und kann von allen vier Mitgliedern der Rezeptorfamilie aktiviert werden. Der PI3K (Phosphatidyl-Inositol-3'-Kinase)-AKT-Signalweg kann ebenfalls von den meisten aktiven ErbB-Dimeren induziert werden und vermittelt dabei eine anti-apoptotische Zellantwort über eine Stimulation der Proteintranslation und der Proliferation. Unterschiede bezüglich der Kinetik und Potenz seiner Aktivierung rühren daher, dass c-erbB1 und c-erbB2 die p85 Untereinheit nur indirekt über Adaptermoleküle binden können, c-erbB3 und c-erbB4 hingegen über sechs bzw. eine direkte Bindungsstelle für die regulatorische p85-Einheit von PI3K verfügen und damit ein extrazelluläres Signal effektiver ins Zellinnere weiterleiten können. Weitere Signalkaskaden der ErbB-Rezeptorfamilie verlaufen über die Phospholipase C γ (PLC γ) sowie über die JAK (*Janus Kinase*)/STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Proteine (1;4;6). Heterodimeren wird in Bezug auf die Signalgebung ein stärkeres Potential zugeschrieben als Homodimeren (6). Die Stärke und Dauer intrazellulärer Signalweiterleitung wird über Mechanismen wie die Rezeptorinternalisierung und -degradation ebenso wie das Rezeptor-*Recycling* kontrolliert und kann über positive und negative *feedback*-Schleifen moduliert werden. Diese Prinzipien des Rezeptor-*Sortings* basieren in erster Linie auf der Zusammensetzung des Dimers und der Art des gebundenen Liganden. C-erbB1-Homodimere unterliegen einer schnellen *Downregulation* mit Hilfe von Clathrin umhüllten Endozytosevesikeln und werden anschließend lysosomal abgebaut (22). C-erbB3-Homo- und -Heterodimere hingegen werden bevorzugt wiederverwendet und eine Assoziation mit c-erbB2 ermöglicht neben verlangsamten Endozytoseraten auch einen beschleunigten Rücktransport an die Zelloberfläche. Weitere Möglichkeiten der Feinregulation ergeben sich beispielsweise durch die Terminierung von Signalketten auf Rezeptorebene mit Hilfe von Phosphatasen (19;22). Die komplexen Möglichkeiten zur Signaldiversifikation auf der einen Seite und das feine Netzwerk an Kontrollmechanismen auf der anderen Seite weisen der Familie der ErbB-Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Regulation vieler Zellfunktionen zu. Dazu gehören neben Angiogenese, Migration und Proliferation auch die Adhäsion, Apoptose und Differenzierung von Geweben (1;4;6).

1.1.4 Von der Normalfunktion zur Tumorentstehung

Die kritische Funktion von ErbB-Rezeptoren in der Embryogenese und auch in der späteren Entwicklung von Wirbeltieren manifestiert sich anhand von Versuchen mit *knock-out* Mäusen. Kein Verlust eines ErbB-Rezeptors bleibt dabei mit dem Leben vereinbar. Dem EGFR werden Funktionen in der Regulation epithelialer Komponenten, insbesondere der Haut, Lunge, Niere und des Gastrointestinaltrakts zugeschrieben. Weiterhin werden die ErbB-Rezeptoren für eine regelrechte Entwicklung und Funktion neuronaler und kardialer Strukturen verantwortlich gemacht (5;18;22-24). Dass die ErbB-Rezeptorfamilie aber auch beim erwachsenen Organismus entscheidende Vorgänge mit beeinflusst, kann am besten am Beispiel der weiblichen Brustdrüse veranschaulicht werden. Die Mamma enthält alle vier Subtypen an ErbB-Rezeptoren in zell- und entwicklungsspezifischen Expressionsmustern. Zum Zeitpunkt der Geburt ist das Gangsystem der Mamma nur rudimentär entwickelt und vollzieht seine Proliferation und Differenzierung größtenteils postnatal. C-erbB1 vermittelt dabei den größten Teil des duktales Wachstums, während c-erbB2 und c-erbB4 vor allem in der Schwangerschaft

durch die Induktion der lobuloalveolären Differenzierung und Laktation an Bedeutung gewinnen. (6;23). Die dramatischen Folgen abnorm regulierter Rezeptorfunktionen oder des Rezeptorverlustes selbst unterstreichen also die herausragende Rolle von Heterodimeren bei zahllosen Entwicklungsprozessen und betonen die Notwendigkeit einer streng regulierten Signaltransduktion und -diversifikation während der Organogenese und Entwicklung (18). Eine abnorme Regulation im Signalsystem der Rezeptortyrosinkinasen aufgrund multipler Aberrationen kann zu einer konstitutiv erhöhten Signalkapazität und schlussendlich zur malignen Transformation führen. Derartige kanzerogene Mechanismen umfassen konstitutiv aktivierende Mutationen oder Deletionen im Rezeptorgenom, eine autokrin oder parakrin bedingte Überproduktion von Liganden, eine dysregulierte Koexpression von ErbB-Rezeptoren und eine Überexpression einzelner Rezeptoren selbst (19;22). Zahlreiche Untersuchungen haben die Verbindung von erhöhten Mengen oder mutierten Formen an ErbB-Rezeptoren mit zahlreichen Tumorarten bestätigt. Amplifikationen und Mutationen im EGFR-Gen finden sich so z.B. in multiplen Malignomen des Menschen, insbesondere im Bereich des HNO-Gebiets, der Lunge, des Darms und der Brust (4;25) und sind besonders häufig in Gliomen anzutreffen (4). Die meisten dieser Tumore exprimieren ebenfalls c-erbB3 und c-erbB4, wobei die Heterodimerisierung des Letzteren mit c-erbB2 abgesehen von epithelialen Tumoren besonders beim Medulloblastom des Kindesalters von prognostischer Bedeutung ist. Das onkogene Potential von c-erbB2 und seine Verwicklung in viele Formen menschlicher Karzinome ist bis jetzt am besten charakterisiert. Eine Überexpression von c-erbB2 – meist aufgrund einer Genamplifikation – findet sich in 20-30% der Mamma- und Ovarialkarzinome und ist mit einem aggressiven Tumorwachstum und einer schlechten Prognose assoziiert (4;6;18). Infolge der hohen Rezeptordichte an c-erbB2 kommt es zur spontanen Formation von Homo- und auch Heterodimeren, die in einer Liganden-unabhängigen Zelltransformation resultieren kann (4;18). Den Rezeptorkomplex mit dem stärksten mitogenen und transformierenden Potential stellt dabei eine aus c-erbB2 und c-erbB3 bestehende Heterodimerformation dar. Ihr gleichzeitiger Anschluss an den Raf-MAPK- und den PI3K/AKT-Signalweg, ihre Fähigkeit zur prolongierten Signalleitung und ihre geringe *Downregulation* tragen maßgeblich zur neoplastischen Entwicklung bei (2;6;11;23). Tumorwachstum erfolgt in mehreren Schritten und erfordert den Erwerb zusätzlicher Fähigkeiten bis zum Erreichen des vollständig malignen Erscheinungsbildes. Auch an diesem vielschichtigen Prozess hat die Gruppe der ErbB-Rezeptoren als Aktivator der Proliferation, der Angiogenese und der Migration einen erheblichen Anteil. Das unkontrollierte Wachstum von Tumorzellen bis hin zu ihrer Invasion und Metastasierung steht somit in einem eindeutigen Zusammenhang mit den ursprünglichen Rezeptorfunktionen aller vier ErbB-Vertreter (23).

1.2 DAS MAMMAKARZINOM

1.2.1 Klinische Eckdaten

Das Mammakarzinom ist ein bösartiger Tumor, der seinen Ursprung vom Epithel der Drüsenlobuli oder der Milchgänge nimmt. In der westlichen Welt stellt es die häufigste maligne

Erkrankung der Frau mit einer Inzidenz von 110 Erkrankungsfällen pro 100.000 Einwohner und Jahr dar und nimmt nach dem Lungenkarzinom den zweiten Platz in der Statistik der tödlichen Tumoren ein. Demnach entwickelt jede achte bis zehnte Frau im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom, wobei die Morbiditätsrate in den letzten Jahren zugenommen hat (26;27). Endogene Faktoren scheinen bei der Karzinogenese ebenso eine bedeutende Rolle zu spielen wie exogene Einflüsse oder hereditär bedingte Mutationen. Das Mammakarzinom entwickelt sich biphasisch über intraepitheliale *in-situ*-Läsionen, die nach mehrjähriger Latenz ein infiltrierendes Stadium erreichen und die Basalmembran überschreiten können. Histologisch gesehen sind die meisten Mammakarzinome mit ca. 85-90% duktaler Genese, 10-15% entwickeln sich aus dem Epithel der Lobuli. Der Übergang vom duktalem Carcinoma *in-situ* (DCIS) in ein invasives duktales Karzinom erfolgt rasch, invasive lobuläre Karzinome hingegen gehen erst nach relativ langer Latenzzeit aus einem lobulären Carcinoma *in-situ* (CLIS) hervor. Insgesamt überwiegt der Anteil der invasiven Karzinome mit 85-95% deutlich gegenüber dem der nichtinvasiven. Das Mammakarzinom findet sich mit 55% am häufigsten im oberen äußeren Quadranten. Abhängig von der histomorphologischen und biologischen Charakterisierung kann eine Metastasierung bereits früh erfolgen und weist eine eindeutige Korrelation mit der Tumorgroße auf. Lymphogen metastasieren die Tumorzellen meist in die regionären Lymphknoten, Organe der hämatogenen Metastasierung stellen das Skelettsystem, die Pleura, die Lunge, die Leber, das Gehirn und in seltenen Fällen auch das Ovar dar. Ist die Lokalisation des Tumors günstig, so wird heutzutage standardmäßig eine brusterhaltende operative Therapie (BET) mit anschließender postoperativer Radiatio durchgeführt. Die Therapieansätze zur Behandlung von Brustkrebs sind multimodal gestaltet und schließen neben der Operation und der Bestrahlung die Hormon- und Chemotherapie ebenso wie supportive Maßnahmen mit ein. Ausschlaggebend für die Wahl spezieller adjuvanter systemischer Therapien ist dabei die Tumorbiologie. So stellen heute der Hormonrezeptorstatus, also der Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Tumorgewebe, ebenso wie der Her2/neu-Status im Sinne eines amplifizierten c-erbB2-Rezeptors die wichtigsten prognostischen Faktoren der Erkrankung dar (26).

1.2.2 Das Her2/neu überexprimierende Mammakarzinom

Seit der Detektion des amplifizierten c-erbB2-Onkogens in humanen Brustkrebszellen vor 25 Jahren (28), stehen der EGFR und c-erbB2-Rezeptor verschärft im Mittelpunkt vergangener und gegenwärtiger Mammakarzinomforschung. Eine Überexpression von c-erbB2 konnte bei 25-30% der Mammakarzinompatientinnen nachgewiesen werden und beruht laut FISH-Analysen in 97% der Fälle auf einer Amplifikation des zugrunde liegenden Gens auf Chromosom 17 selbst (29). Der prognostische Wert einer c-erbB2-Überexpression wurde 1987 erstmals von Slamon et al. beschrieben, indem eine erhebliche Korrelation zwischen der Genamplifikation mit sämtlichen Krankheitsparametern unter besonderer Berücksichtigung von rezidivfreiem und Gesamtüberleben hergestellt werden konnte (9). Patientinnen, die an einem Her2/neu überexprimierenden Mammakarzinom leiden, weisen eine deutlich erhöhte Mortalitätsrate (30), ein aggressives Tumorstadium (31) und damit eine insgesamt sehr schlechte Prognose auf (9;30;31). Morphologisch und klinisch imponiert das Her2/neu

überexprimierende Mammakarzinom durch frühzeitige Lymphknoteninfiltration, hohes Metastasierungsrisiko, hohe Rezidivneigung, einen hohen Anteil aneuploider und stark proliferierender Zellen sowie durch ein schlechtes nukleäres *Grading* (23;30;31). Ein gewisser Anteil an c-erbB2 überexprimierender Mammakarzinome zeigt ein simultan erhöhtes Koexpressionsmuster für den EGFR und ist aufgrund einer vermehrten Aktivierung mitogener und anti-apoptotischer Signale ebenso mit einem besonders aggressiven Phänotyp und einer schlechten Prognose assoziiert (8;32). Trotz der stummen Kinaseaktivität des c-erbB3-Rezeptors lassen einige Studien auf eine starke Korrelation zwischen einer c-erbB2 und c-erbB3 Überexpression mit einer Tendenz zu verstärktem Tumorwachstum schließen. So erweist sich das dritte Mitglied der Rezeptorfamilie ebenfalls als nützlicher prädiktiver Faktor und ist bei der weiteren Stratifizierung von Risikogruppen von Nutzen (8;33). Langzeitstudien an größeren Patientenkollektiven haben ergeben, dass c-erbB1-/c-erbB2- und c-erbB3-Positivität typischerweise mit Östrogenrezeptornegativität (ER⁻) assoziiert war und ein signifikant schlechteres 10-Jahres-Überleben bot als die Kombination ER⁻ und c-erbB1/c-erbB2/c-erbB3 negativ oder ER⁻ und c-erbB4 positiv. Patienten mit ER⁺ und c-erbB1/c-erbB2/c-erbB3 negativen oder c-erbB4 positiven Tumoren stellten die Subgruppe mit dem besten prognostischen Profil dar (8). Die Rolle von c-erbB4 bei der Karzinogenese und seine Bedeutung im Hinblick auf Therapie und Prognose wurden in den letzten Jahren kontrovers diskutiert. In der Literatur finden sich Angaben, die den c-erbB4 als prognostisch ungünstigen Marker klassifizieren und ihm ein onkogenes Potential zuweisen (34). In den letzten Jahren häufen sich jedoch Daten, die einem erhöhten Koexpressionslevel an c-erbB4 einen positiven Einfluss auf den Verlauf einer Her2/neu überexprimierenden Mammakarzinomkrankung zuschreiben. Eine Minimierung des Rezidivrisikos, eine geringere Tumorprogression, höhere Überlebensraten und sogar ein verbessertes Ansprechen auf *target*-spezifische Therapien konnten unter anderem dokumentiert werden (8;16;35). Neuerdings wird sogar eine Tumorsuppressorfunktion des c-erbB4 diskutiert, die in Brusttumoren aufgrund epigenetischer Promotorhypermethylierung supprimiert sein soll (36). Die Rolle des c-erbB4-Rezeptors beim Mammakarzinom muss wohl im Kontext seiner biologisch vorliegenden Isoform, seiner zellulären Lokalisation, seiner Epigenetik und der Koexpression weiterer ErbB-Mitglieder interpretiert werden (14). Ebenso gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass ErbB-Rezeptoren in einer Art bidirektionalem *Crosstalk* an der Aktivierung weiterer Rezeptoren und Signalwege beteiligt sind. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die gegenseitige Modulation und Beeinflussung von ErbB-Proteinen und dem Östrogenrezeptor. Die gleichzeitige Anwesenheit von überexprimiertem EGFR bzw. Her2/neu bei einer Hormonrezeptor-positiven Brustkrebserkrankung kann so im Gefolge einer synergistisch aktivierten Tumorpheriferation die Entstehung von *de-novo* Resistenzen gegenüber dem selektiven Östrogenrezeptormodulator (*SERM*) Tamoxifen erklären (24). Gerade diese Fähigkeit der ErbB-Rezeptoren, das Tumorwachstum über eigene und parallele Signalwege modulieren und steuern zu können, macht sie zu attraktiven pharmakologischen Angriffspunkten in der Brustkrebstherapie.

1.3 DER C-ERBB2 ALS *TARGET* IN DER MAMMAKARZINOMTHERAPIE

1.3.1 Der monoklonale Antikörper Trastuzumab in Forschung und Klinik

Die spezifisch gegen den c-erbB2 gerichtete Brustkrebstherapie gliedert sich gegenwärtig in zwei grundlegend verschiedene Ansätze. Eine davon stellen humanisierte monoklonale Antikörper (mAb) dar, die sich gegen die Extrazellulärdomäne des c-erbB2 richten. Die bekannteste Anti-Tumor-Substanz dieser Art stammt von der Firma Genentech und ist unter dem Namen Trastuzumab (4D5) bzw. dem Handelsnamen Herceptin® bekannt geworden. Ihren molekularen Angriffsort repräsentiert dabei ein spezifisches Epitop in der Subdomäne IV der Extrazellulärregion von c-erbB2 (37). Experimentellen Analysen zufolge ist die Anti-Tumor-Aktivität von Trastuzumab auf zweierlei Mechanismen zurückzuführen, nämlich auf die antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität einerseits und andererseits auf die Blockade von Her2-*getriggerten* Proliferationssignalen (37). *In-vivo* und *in-vitro* Untersuchungen zum Wirkmechanismus von Herceptin® belegten die verstärkte Formation von Her2-Homodimeren, die einer vermehrten *Downregulation* durch Endozytose unterlagen. Zusätzlich konnte eine Verminderung von Angiogenese und Tumorwachstum ebenso wie eine Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose sowie eine Aktivierung verschiedenster Immunmechanismen verzeichnet werden (23;37-39).

Bereits früh ergaben sich eindeutige Hinweise auf synergistische und additive Effekte von Trastuzumab in der Kombination mit konventionellen Zytostatika. Dies konnte in großen randomisierten klinischen Studien belegt werden, in denen die Behandlung des metastasierten Her2/neu überexprimierenden Mammakarzinoms mit Trastuzumab plus Anthrazyklin- bzw. Taxan-haltiger Chemotherapie deutliche Vorteile gegenüber einer alleinigen Chemotherapie in den Endpunkten progressionsfreie Zeit, objektive Responstrate und Gesamtüberleben zeigte (40). Ebenso große Erfolge waren im Einsatz als Monotherapeutikum bei fortschreitender metastasierender Erkrankung trotz mehrerer Standard-Chemotherapiezyklen zu verzeichnen (41). Damit erhielt Herceptin® 1998 von der FDA (*US Food and Drug Administration*) seine Zulassung als alleiniges oder mit Taxanen kombiniertes *first-* und *second-line* Therapeutikum für die Behandlung des c-erbB2 überexprimierenden, metastasierten Mammakarzinoms und wird auch in Deutschland seit dem Jahr 2000 routinemäßig für diese Art der Indikationsstellung angewandt (38). Dabei können allerdings nur Patientinnen einer Herceptintherapie zugeführt werden, deren Primärtumoren auch tatsächlich eine eindeutige Überexpression an c-erbB2 aufweisen. Zur genauen Analyse des Rezeptorstatus in Tumorproben stehen hierbei die Immunhistochemie (IHC) und die (Fluoreszenz-) *in-situ* Hybridisierung (FISH) zum Nachweis einer Proteinüberexpression bzw. Genamplifikation zur Verfügung (24). In der Routine hat sich die IHC durchgesetzt und gilt bei einem Score von 3+ als eindeutig positiv. Eine Überexpression bei einem Score von 2+ sollte zusätzlich durch eine FISH-Analyse als dem geltenden Goldstandard verifiziert werden (24;37;38). Basierend auf der überzeugenden Datenlage zu den Ergebnissen von Trastuzumab im metastasierten Krankheitsstadium wurde im Rahmen von fünf großen prospektiv-randomisierten Studien (BCIRG 006, FinHer, HERA, Intergroup 9831, NSABP B-31) der Nutzen von Trastuzumab zu früheren Zeitpunkten der Erkrankung überprüft.

Allen Untersuchungen zufolge ergab sich eine Reduktion des Rezidivrisikos um 50% und eine Verringerung des Sterberisikos um ca. 33% und resultierte in der Zulassung durch die FDA/ EMEA (*European Medicines Agency*) für den adjuvanten Einsatz als Begleitung zur Standard-Chemotherapie oder Radiatio (37;39). Erst kürzlich konnte durch drei große Phase-III-Studien (MDACC, NOAH und die deutsche GeparQuattro-Studie) ein erheblicher Benefit für Mammakarzinompatientinnen durch die präoperative Trastuzumabgabe demonstriert werden. Die Raten kompletter histopathologischer Remission reichten bis zu 65%. Zusätzlich konnten Verbesserungen im Bezug auf krankheitsfreies und Gesamtüberleben sowie krankheitsbezogene Ereignisse festgehalten werden (42). Aufgrund dieser ermutigenden Daten wurde vom *National Comprehensive Cancer Network* die Empfehlung ausgesprochen, alle Patientinnen mit einer operablen, lokal fortgeschrittenen Her2-positiven Brustkrebserkrankung mit einem neoadjuvanten Regime aus Paclitaxel plus Trastuzumab, gefolgt von 5-Fluoruracil, Epirubicin und Cyclophosphamid (FEC) plus Trastuzumab zu behandeln (42).

Trotz der beeindruckenden Studienergebnisse gestaltet sich die klinische Realität nicht durchweg positiv. Protokollen der FDA/EMEA zufolge können nur 50% der Patientinnen in der adjuvanten Behandlungssituation tatsächlich geheilt werden (39). Metastasierter Brustkrebs bleibt weiterhin unheilbar und entwickelt sogar mehrheitlich nach initialem Ansprechen auf die Herceptintherapie *de-novo* Resistenzen innerhalb des ersten Jahres mit erneuter Tumorprogression (37;38). Für das einsetzende Therapieversagen existieren mannigfaltige molekulare Erklärungsansätze. Neben einer sterisch gehinderten Interaktion zwischen c-erbB2 und Trastuzumab durch größere Membranoberflächenproteine wie CD44 und MUC4 wird über den Verlust des durch Trastuzumab spezifisch erkannten Epitops in der ECD durch proteolytisches Rezeptor*shedding* und folglich das Entstehen einer unsensitiven p95Her2-Rezeptoreinheit berichtet. Außerdem spielen die durch den ER und IGF1R (*insulin-like growth factor receptor 1*) vermittelte alternative Aktivierung des PI3K-AKT- bzw. des Ras/MAPK-Signalweges ebenso wie der Funktionsverlust des Regulatorproteins PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) im PI3K-AKT-Weg eine wesentliche Rolle bei der Resistenzentwicklung (37-39).

Protein	Resistenzmechanismus gegenüber Trastuzumab
ErbB-Rezeptoren	alternative Rezeptordimerisierung und Signalgebung
IGF1R ER	Alternative Aktivierung von Signalwegen
MUC4 CD44	Sterische Hinderung durch größere Membranoberflächenproteine
p27 ^{Kip1}	Funktionsverlust verhindert Zellzyklusarrest
p95Her2	Rezeptor <i>shedding</i> mit Verlust der Trastuzumab-Bindestelle
PTEN	Funktionsverlust mit konstitutiver PI3K-/AKT-Aktivierung

Tabelle 1: Übersicht über die verschiedenen Resistenzmechanismen gegenüber Trastuzumab; in Anlehnung an (38)

1.3.2 Der monoklonale Antikörper Pertuzumab in Forschung und Klinik

Der rekombinante monoklonale Antikörper Pertuzumab (2C4) von Genentech, auch bekannt unter dem ehemaligen Handelsnamen Omnitarg®, bindet im Gegensatz zu Trastuzumab an die Subdomäne II der Extrazellulärregion von c-erbB2 und verhindert insbesondere aus sterischen Gründen auch seine Heterodimerisation mit anderen Her-Rezeptoren. Als so genannter Dimerisierungsinhibitor besitzt er das Potential, die Signalkaskade weiterer Her-Rezeptormitglieder und damit auch die Proliferation von Zellen mit mäßiger c-erbB2-Expression zu inhibieren (38;43). Ein Synergismus zwischen Trastuzumab und Pertuzumab konnte *in-vitro* bei Mammakarzinomzellen in einer gesteigerten Apoptose (44) und vermehrtem G₀-Exit (43) gesehen werden und zeigte sich auch im Rahmen einer Phase-II-Studie im verbesserten Ansprechen von Patientinnen mit metastasiertem, Her2-positivem und Trastuzumab-refraktärem Mammakarzinom auf eine Kombinationstherapie (45). Untersuchungen zur kombinierten Anti-Tumor-Aktivität von Trastuzumab und Pertuzumab plus Docetaxel werden derzeit in der Phase-III-Studie (CLEOPATRA) an Patientinnen im metastasierten Stadium evaluiert (38) und erwecken Hoffnungen auf eine neue Frontlinientherapie für das metastasierte Her2-positive Mammakarzinom (37).

1.3.3 Der duale c-erbB1/c-erbB2 Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib in Forschung und Klinik

Den zweiten Ansatz auf dem Feld der „*targeted therapy*“ gegen den im Mammakarzinom überexprimierten c-erbB2-Rezeptor repräsentiert die Gruppe der Tyrosinkinaseinhibitoren (TKI). Zu diesen so genannten *small molecules* gehört auch Lapatinib (GSK572016) – oder Tyverb® – von GlaxoSmithKline. Hierbei handelt es sich um einen oral zu verabreichenden, dualen und reversiblen Tyrosinkinaseinhibitor, der die ATP-Bindestellen der Tyrosinkinasen von c-erbB1 und c-erbB2 kompetitiv antagonisiert und somit ihre Autophosphorylierung und konsekutive Signaltransduktion unterbinden kann (37;39;46). In präklinischen Untersuchungen konnte bereits die stark inhibitorische Potenz von Lapatinib auf die Signalwege Ras-/MAPK und AKT mit ansteigender Apoptoserate demonstriert werden (47). Neueste Erkenntnisse über eine Reinduktion der Apoptose in Trastuzumab-resistenten Brustkrebszelllinien u.a. aufgrund eines inhibierten *Cross-talks* zum IGF1R (48) und einer *in-vitro* und *in-vivo* nachgewiesenen Inhibition der *gsheddeten* p95-Rezeptoreinheit bestätigten Lapatinib (49) als vielversprechende Innovation in der Brustkrebstherapie. Zudem lassen neueste Erkenntnisse auf eine Verstärkung der durch Herceptin® eingeleiteten ADCC mittels Lapatinib-Therapie in Mammakarzinomzellen schließen (50). Eine Phase-III-Studie (EGF 100151) an Patientinnen, die an Her2 überexprimierendem, metastasiertem Brustkrebs erkrankt und bereits erfolglos mit Taxanen, Anthrazyklinen und Trastuzumab vorbehandelt waren, verdeutlichte die Überlegenheit von Lapatinib in Kombination mit Capecitabine gegenüber einer alleinigen Capecitabine-Monotherapie. In den primären und sekundären Endpunkten bot die zusätzliche Gabe von Lapatinib mit einer Responstrate von 22% gegenüber 14% und einer progressionsfreien Zeit von 27,1 gegenüber 18,6 Wochen einen deutlichen Vorteil und wurde deswegen 2007 von der FDA/EMA zugelassen. Die kombinierte Anwendung von Lapatinib und Capecitabine wurde

dabei auf fortgeschrittene und metastasierte Fälle von Brustkrebs mit Her2 Überexpression und Tumorprogression trotz oben beschriebener Vorbehandlung beschränkt (37;39;46). Die positiven Studienergebnisse zum metastasierten Mammakarzinom gaben Anlass zu weiteren Nachforschungen über den adjuvanten und neoadjuvanten Nutzen von Lapatinib. Derzeit werden in der ALLTO- und NeoALLTO-Studie vergleichende Untersuchungen zum adjuvanten bzw. neoadjuvanten Einsatz von Lapatinib, Trastuzumab oder beiden Biologika zusätzlich zur konventionellen Therapie angestellt (37;39;42). Ebenso ist Lapatinib aufgrund seiner ZNS-Gängigkeit ein neuer Hoffnungsträger in Bezug auf die Therapie und Prävention von ZNS-Metastasen, die momentan noch keiner systemischen Therapie zugänglich sind (39;46). Zudem gibt es bereits Erkenntnisse darüber, dass Lapatinib in der Lage ist, aberrante Wachstumsfaktor-Signalwege zu unterbinden und einen modulierenden Einfluss auf die Funktion des Östrogenrezeptors zu nehmen. Lapatinib kann so in Kombination mit einer endokrinen Therapie eine erneute Wachstumsinhibition in resistenten Zellen bewirken (51). Erst kürzlich erhielt Lapatinib daher seine Zulassung für die *first-line* Therapie postmenopausaler Patientinnen mit c-erbB2 und Hormonrezeptor-positivem Brustkrebs, die derzeit nicht für eine Chemotherapie vorgesehen sind (52). Der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib ist also eine vielversprechende Alternative, weil er eine weitere Therapieoption für Trastuzumab-resistente Her2-positive Mammakarzinompatientinnen eröffnet und gerade in der Kombination mit konventioneller oder weiterer *target*-spezifischer Therapie seine Wirksamkeit unter Beweis stellt.

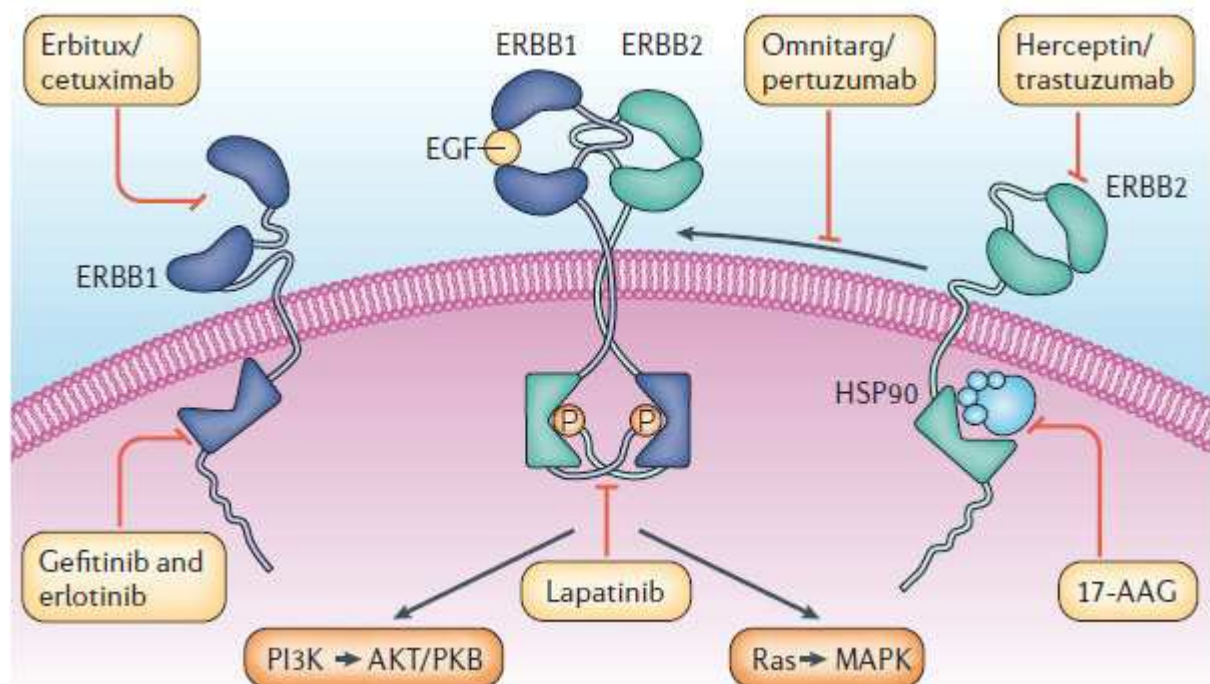


Abbildung 3: Zusammenfassung der gegen c-erbB1 und c-erbB2 gerichteten spezifischen Therapiestrategien: Trastuzumab (Herceptin®) und Pertuzumab (früher Omnitarg®) sind monoklonale Antikörper für den c-erbB2 und werden in der Brustkrebstherapie eingesetzt. Cetuximab (Erbix) wird als monoklonaler Antikörper für den c-erbB1 in der Therapie des kolorektalen Karzinoms verwendet. Zu den c-erbB1-spezifischen Tyrosinkinaseinhibitoren gehören Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva) und sind für die Therapie des nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms zugelassen. Lapatinib ist ein dualer Tyrosinkinaseinhibitor für den c-erbB1

und c-erbB2 in der Brustkrebstherapie. 17-AAG repräsentiert einen neuen Ansatz target-spezifischer Therapien und inhibiert die Abdissoziation des Hitzeschockproteins HSP90 von c-erbB2 (19).

1.4 ZIELSETZUNG

Die Überexpression des c-erbB2-Rezeptors im humanen Mammakarzinom ist von großer klinischer und therapeutischer Relevanz. Seit über zehn Jahren findet nun schon der monoklonale Antikörper Trastuzumab Anwendung in der Therapie dieser Mammakarzinom-spezies. Das Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie ist jedoch stark variabel und reicht von vollständiger Remission bis hin zur Resistenz und kann daher nicht auf der alleinigen Grundlage der Rezeptorüberexpression vorhergesagt werden. In den vergangenen Jahren haben sich jedoch auf dem Gebiet der ErbB-spezifischen *target*-Strategien verschiedenste neue Entwicklungen behauptet, die entweder noch die unterschiedlichen Phasen klinischer Erprobung durchlaufen oder bereits Einzug in die Klinik gefunden haben. Besonders der seit 2007 zugelassene Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib und der monoklonale Antikörper Pertuzumab stellen attraktive alternative Optionen für die Behandlung Trastuzumab-resistenter Mammakarzinompatientinnen dar. Derzeit ist ein klarer Trend in der Brustkrebsforschung zu beobachten, der ein individualisiertes Therapiekonzept auf der Basis eines exakten Tumorprofils postuliert. Hierzu ist es erforderlich, nicht nur die biologische Funktion jeder einzelnen Anti-Tumor-Substanz zu kennen, sondern auch ihre interaktiven Effekte und Besonderheiten genau zu analysieren. Ein gängiges Phänomen in der Therapiesituation stellt allerdings auch die kompensatorische Stimulation von Rezeptoraktivierung und Zellproliferation durch ErbB-Rezeptor eigene Wachstumsfaktoren dar. Die Kompensation einer therapeutischen Tumoringhibition durch diese Wachstumsfaktor-bedingte Gegenstimulation kann ein Therapieversagen hervorrufen und ist daher in der Klinik von großer Bedeutung. Die Erkenntnisse über die Hemmung einer antiproliferativen Zellbehandlung durch Wachstumsfaktor-bedingte Effekte sind derzeit jedoch noch rar.

Im Zentrum dieser Arbeit sollen systematische Untersuchungen zu einer multipel gestalteten EGFR/ErbB2-Rezeptorblockade sowie zur Rolle interferierender Wachstumsfaktoren in der Tumorthherapie stehen. Hierzu wurden die beiden c-erbB2 überexprimierenden Tumorzelllinien BT474 und SK-BR-3 herangezogen, zu denen bereits wichtige Daten aus Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe vorlagen und die durch ihr unterschiedliches Verhalten Einblicke in die so variabel gestaltete klinische Situation gewähren können. Im Hauptaugenmerk der Untersuchungen stehen einerseits die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab und andererseits der Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib – drei Anti-Tumor-Substanzen, die bereits vielfach untersucht und modular eingesetzt werden. Hierbei soll es um folgende konkrete Fragestellung gehen: Inwieweit spielen Wachstumsfaktoren im untersuchten System eine Rolle und kann andererseits ihr kompensatorischer Einfluss durch eine modular gestaltete Tumorthherapie überwunden werden? Die Experimente hierzu wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie ebenso wie auf proteinchemischer Ebene durchgeführt.

Dynamische Proliferationsanalysen mit Hilfe der BrdU/Hoechst-*Quenching* Technik sollen Aufschluss über die potentiellen kompensatorischen Effekte von EGF und HRG auf verschiedene Kombinationen von Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib geben. Hiermit sind zwei an den EGFR bzw. an Her3/Her4 bindende Wachstumsfaktoren vertreten. Zusätzlich sollen Unterschiede in der Sensitivität und dem Erholungspotential der beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 gegenüber unterschiedlichen Expositionszeiten und Konzentrationen von Lapatinib herausgearbeitet werden. Annexin-V-FITC Messungen sollen weiterhin apoptotische Effekte verschiedener Einzel- und Kombinationsbehandlungen beleuchten.

Durch Western-Blot-Analysen sollen der Behandlungs-spezifische Phosphorylierungsgrad des EGFR und c-erbB2-Rezeptors mit der Zellzykluskinetik in Korrelation gebracht werden und das Ansprechen auf Kombinations- und Einzeltherapien u.a. über die Deaktivierung der Signalmoleküle Phospho-AKT und Phospho-ERK1/2 nachvollzogen werden. Um eventuelle Schlüsselproteine in der behandlungsabhängigen Signalkette zu identifizieren, wird ein Antikörper-Protein-Array eingesetzt.

Die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten und *Signaling* von Einzel- und Kombinationsbehandlungen sollen Einblicke in eine multimodal gestaltete Therapie erlauben. Zusätzlich könnte eine diagnostische Evaluation von Wachstumsfaktoren in Tumorproben und die Analyse ihrer Funktion in der Behandlungssituation im Sinne einer individualisierten Therapiestrategie eine Optimierung der klinischen Therapie ermöglichen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE FLUORESZENZANALYTIK

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie erfolgt die Analyse biologischer, chemischer, physikalischer und biophysikalischer Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Diese Technik kommt hauptsächlich dann zum Einsatz, wenn bestimmte Zellen und Zellpopulationen hinsichtlich ihrer biophysikalischen Eigenschaften, wie z.B. Antigenexpression oder DNA-Gehalt, unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen oder Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörpern phänotypisiert werden sollen (53). Die Durchflusszytometer FACSCanto II und LSR II entsprechen sich in ihrem grundsätzlichen Aufbau und sind gegliedert in ein Flüssigkeitssystem, ein optisches System und eine Detektionseinheit. Durch eine sich anschließende Elektronik können die so generierten optischen Signale in elektrische Signale umgewandelt und der weiteren Datenverarbeitung durch einen Computer zugeführt werden. Ziel durchflusszytometrischer Analysen ist es, nur jeweils eine Zelle an einem gebündelten Laserstrahl zu einem bestimmten Zeitpunkt vorbeizuführen. Dieser Aufgabe wird das Flüssigkeitssystem beider Geräte gerecht, indem es jede Zelle in einer Einzelzellsuspension perl schnurartig an den auf verschiedenen Ebenen eintreffenden Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen vorbeileitet. Dabei verhindert die so genannte „hydrodynamische Fokussierung“ durch laminare Strömungseigenschaften eine Durchmischung von Proben- und Trägerflüssigkeit.

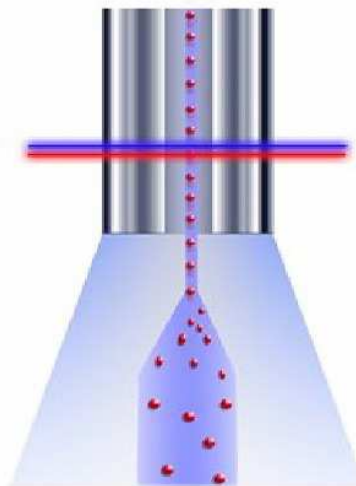


Abbildung 4: Strahlengang in der Durchflussküvette bei niedriger Durchflussrate (54)

Wenn Zellen oder Partikel durch einen gebündelten Laserstrahl hindurch treten, wird Licht in alle Richtungen gestreut. Neben der Fluoreszenz werden dabei das Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, *FSC*) in einem Winkel von 1,5° und 10° zur Strahlenrichtung des Anregungslasers und das Seitwärtsstreulicht (*side scatter* *SSC*) in einem Winkel von ca. 90° zur Darstellung

bestimmter physikalischer Eigenschaften erfasst. Während das FSC-Signal Aufschluss über relative Unterschiede in der Zellgröße liefert, bringt das SSC-Signal Unterschiede bezüglich intrazellulärer Komplexität und Granularität zur Darstellung. Das stärkere FSC wird durch eine Photodiode digitalisiert und zur Datenerfassung an einen Computer weitergeleitet. Die Erfassung des schwächeren SSC-Signals hingegen erfolgt über einen Photodetektor, wie es für Fluoreszenzen üblich ist.

2.1.1 Das Durchflusszytometer FACSCanto II

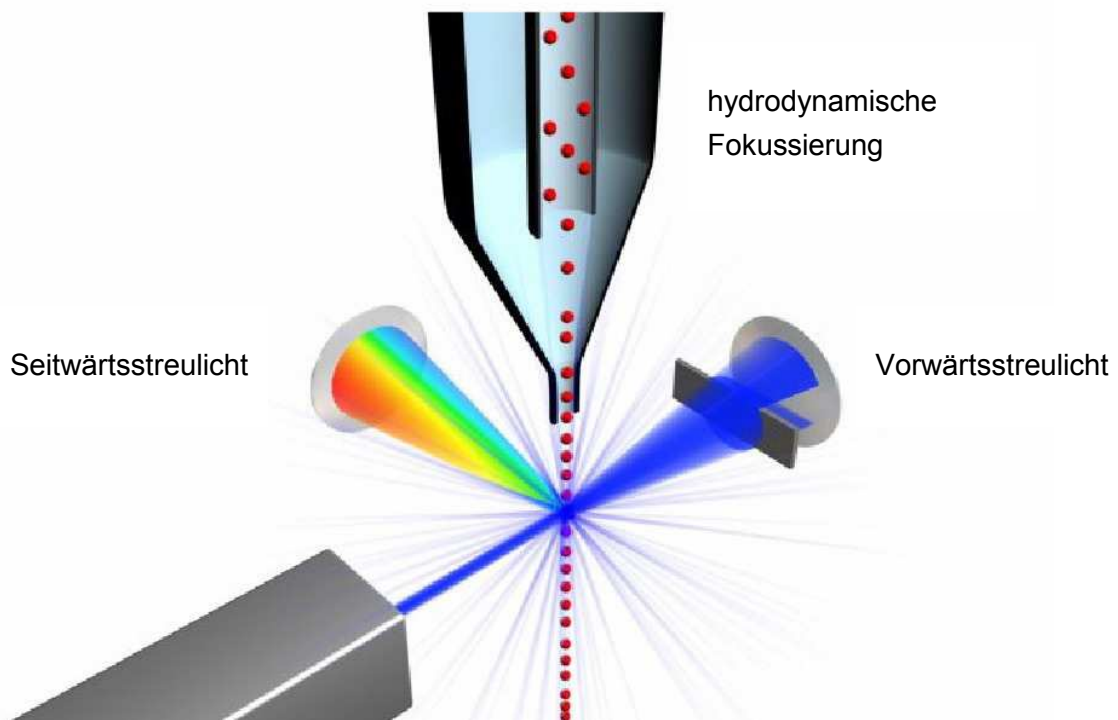


Abbildung 5: Schematischer Strahlengang im Durchflusszytometer (54)

Zur Anregung von Zellen besitzt das FACSCanto II einen blauen (488 nm), einen roten (633 nm) und einen violetten (405 nm) Laser. Wenn die mit Fluorochromen gefärbten Zellen die Ansaugvorrichtung passieren und durch den Laserstrahl hindurchtreten, können die Farbstoffe Photonen absorbieren und so in einen angeregten Zustand überführt werden. Die bei der Rückkehr in den Grundzustand frei werdende Energie wird dabei als Fluoreszenz bezeichnet und ist durch weitaus längere Wellen charakterisiert als solche, die zur Anregung erforderlich waren. Die Detektion unterschiedlicher Farbstoffe durch nur drei Laser beruht also auf der Tatsache, dass sich verschiedene Farbstoffe zwar bei der gleichen Wellenlänge anregen lassen, jedoch aufgrund ihrer individuellen Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen zu detektieren und damit zu unterscheiden sind.

Die optischen Signale des SSC und der Fluoreszenzen werden nun durch eine Sammellinse gebündelt und gelangen zu optischen Filtern. Diese haben die Aufgabe, die Spektralverteilung der zu den Detektoren geleiteten SSC- und Fluoreszenzsignale zu modifizieren. So können optische Filter je nach Beschaffenheit Photonen absorbieren, reflektieren oder passieren lassen,

wobei man grundsätzlich zwischen zweierlei Filtersystemen unterscheidet: Langpassfilter lassen nur Wellenlängen passieren, die die Filtrrate überschreiten und absorbieren oder reflektieren kürzere Wellen. Bandpassfilter hingegen lassen nur einen definierten Wellenlängenbereich hindurch und sind durch zwei Zahlenangaben charakterisiert. Die erste Zahl kennzeichnet dabei das Zentrum des umschriebenen Bereichs, während die zweite Zahl die Bandweite angibt, die der Filter umfasst. Somit lässt also ein 500/50 nm Bandpassfilter nicht nur Licht mit der Wellenlänge 500 nm passieren, sondern auch solches mit Wellenlängen im Bereich von 475 nm bis 525 nm. Nun werden die Lichtsignale über Detektoren in elektronische Signale, auch Pulse genannt, umgewandelt, die letztendlich von der FACS Diva Software in einem Plot veranschaulicht werden können. Wie bereits erwähnt, wird dabei das stärkere FSC über eine Photodiode, schwächere Signale wie das SSC und sämtliche Fluoreszenzen jedoch über so genannte *photomultiplier tubes* (PMTs) abgegriffen. Im FACSCanto II findet sich eine Anordnung von fünf bis sechs PMTs zu einem Octagon und von jeweils zwei bis drei PMTs zu zwei Trigonon. Wenn nun das Licht aus dem Glasfaserkabel in das Octagon gelangt, trifft es zunächst auf einen 735 nm Langpassfilter, der kürzere Wellenlängen automatisch zum nächsten PMT reflektiert. Direkt nachgeschaltet findet sich ein 780/60 nm Bandpassfilter, so dass nur Wellenlängen im Bereich von 750 bis 810 nm PMT A erreichen und somit dem Emissionsspektrum des Farbstoffs PE-Cy7 entsprechen. Wellen mit einer Länge von weniger als 735 nm gelangen nun zu PMT B usw. Auf diese Weise gelangt der Lichtstrahl nacheinander entlang der Anordnung zu den jeweiligen Detektoren, wobei jede Station unterschiedliche Spektrumbereiche erfasst. Das SSC wird bei PMT F gesammelt. Durch die Anordnung im Octagon ist die Messung von bis zu acht Fluorochromen möglich, die alle vom blauen Laser angeregt werden. Analog verhält es sich mit den beiden Trigonon, in denen vom roten bzw. violetten Laser angeregte Farbstoffemissionen ermittelt werden (55).

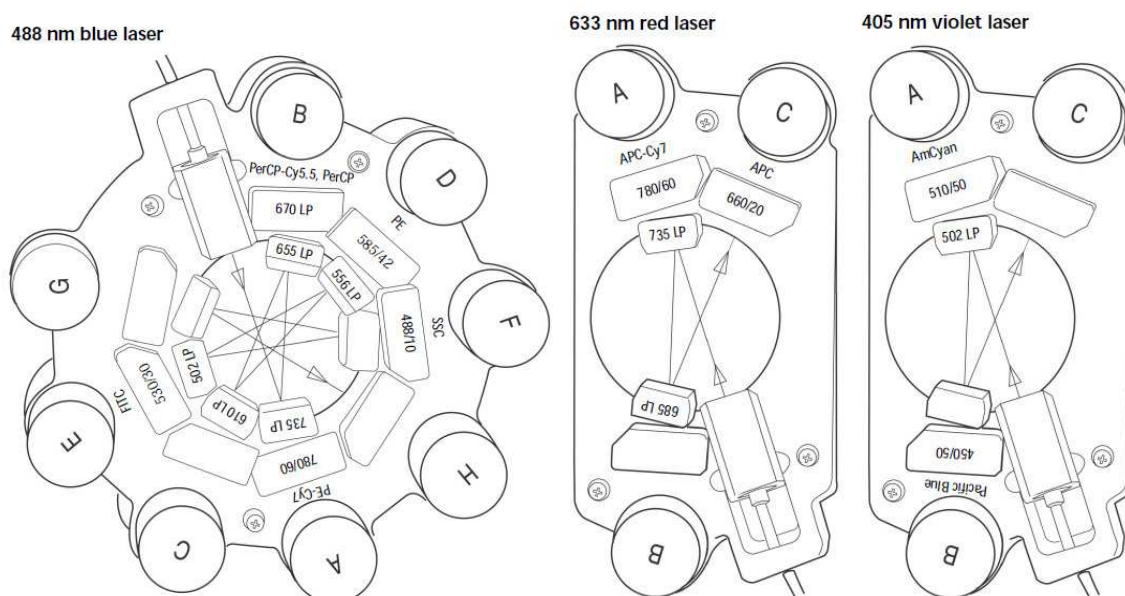


Abbildung 6: Strahlengang in einem Octagon und den Trigonon des FACSCanto II (55)

Innerhalb der PMTs wird nun aus dem optischen ein elektrisches Signal, also ein Puls, erstellt, aus dem die Software *FACSDiva* 6.1.1 für jede einzelne Zelle für deren Verweildauer im Laser

ein Profil über die Gestalt des Pulses erstellt. Dabei ermitteln Pulsprozessoren Merkmale anhand von drei Charakteristika:

- Die Höhe (*=height*) beschreibt die während des Pulses ermittelte maximale Intensität
- Die Fläche (*=area*) entspricht dem Integral des gemessenen Pulssignals über die Zeit, wovon sich der in der Zelle gebundene Fluoreszenzgehalt ableiten lässt (56)
- Die Weite (*=width*) errechnet sich aus der Formel $\text{area}/\text{height} \times 64000$ und erlaubt Rückschlüsse auf die Partikelgröße (56)

Der *Threshold* markiert die Grenze, an der das Gerät anfängt, Signalimpulse zu messen, die *Baseline* stellt das Grundlevel dar.

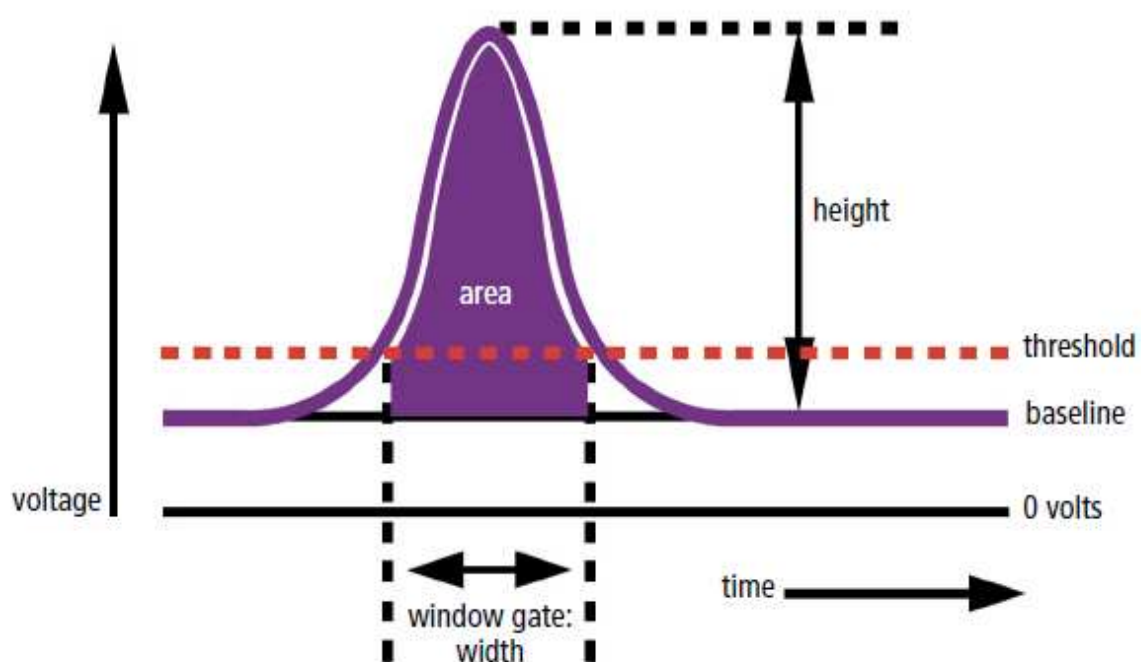


Abbildung 7: Pulssignalgenerierung anhand der Merkmale height, area und width (57)

Die eingebaute Elektronik wird ebenfalls der räumlichen Versetzung der eintreffenden Laserstrahlen gerecht, indem sie die Pulserfassung um die zeitliche Verzögerung korrigiert (57).

2.1.2 Das Durchflusszytometer LSR II

Das Durchflusszytometer LSR II ähnelt dem FACSCanto II hinsichtlich seines Aufbaus, der Detektion und Verarbeitung von Daten, besitzt aber zusätzlich einen UV-Laser (351-363 nm), der hauptsächlich dann zum Einsatz kommt, wenn mit Farbstoffen gearbeitet wird, die durch UV-Licht angeregt werden, z.B. Hoechst. Auch für diese Arbeit wurde ein Großteil der BrdU/Hoechst-*Quenching* Messungen am Durchflusszytometer LSR II zur Bestimmung der G₀-Phase-Fraktionen durchgeführt. Im Verlauf der Laborarbeit konnten jedoch Messungen mit dem Farbstoff Hoechst33258 ebenfalls am FACSCanto II durch Anregung mit Hilfe des violetten Lasers (405 nm) etabliert werden und wurden an diesem Gerät fortgesetzt.

2.1.3 Verwendete Farbstoffe

Die nachfolgende Tabelle zeigt die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Farbstoffe mit den zugehörigen Absorptions- und Emissionsmaxima, ihren Anregungswellenlängen sowie ihre PMT-Position und die zugehörigen Filter im FACSCanto II. Ebenso wird gezeigt, zu welchem Zweck die Untersuchung durchgeführt wurde.

Farbstoff	Absorptions- maximum [nm]	Emissions- maximum [nm]	Anregungs- wellenlänge [nm]	Untersuchung	PMT-Position	Filter
FITC	495	519	488	Apoptose- bestimmung	E	502 530/30
Hoechst	345	478	351-363	Zellzyklusphasen- bestimmung	B	450/50
PI	536	617	488	Apoptose- bestimmung	B	670 655

Tabelle 2: Farbstoffe und technische Daten

2.1.4 Datendarstellung und -verarbeitung

Durchflusszytometrische Messungen können ein- oder mehrparametrisch zur bloßen DNA-Färbung bzw. zur Identifikation weiterer Subpopulationen erfolgen. Zusätzlich unterscheidet man zwischen linearer und logarithmischer Signalverstärkung. Die graphische Darstellung zweier gemessener Parameter bringt der so genannte *Dot*- oder *Density*-Plot zum Ausdruck. Bei dieser zweidimensionalen Graphik wird das SSC bzw. die Intensität eines Farbstoffs auf der Ordinate gegen das FSC bzw. die Intensität eines zweiten Farbstoffs auf der Abszisse aufgetragen. Hiermit gelingt nicht nur die Identifikation intakter, vitaler und gefärbter Zellen, sondern auch ihre Unterscheidung sowohl von Zelltrümmern und Farbstoffaggregaten (Debris) als auch von Zellaggregaten, den Dubletten. Der so genannte Debris besitzt ein schwächeres FSC- und SSC-Signal, während Zelldubletten größer und granulärer als Einzelzellen sind und sich somit durch ein stärkeres FSC und SSC charakterisieren. Da bei DNA-Analysen die Diskrimination von Einzelzellen besonders wichtig ist, können auf der Basis der Pulsprozessortechnologie zeitabhängige Fluoreszenzsignale bei Laser-Lichtanregung ermittelt werden, die die schon erwähnten Höhen-, Flächen- und Weitensignale umfassen. Zellaggregate, die einen größeren Durchmesser besitzen als der Querschnitt des Laserstrahls, können nicht maximal angeregt werden, was sich in einem geringeren Höhengsignal widerspiegelt. Zudem erhöht sich ihr Weitensignal, da Dubletten mehr Zeit benötigen als Einzelzellen, um den Illuminationspunkt zu durchschreiten. Durch diese Technologie wird gewährleistet, dass aggregierte Zellen aufgrund ihres erhöhten Fluoreszenzgehaltes nicht einfach G₂-Phase oder tetraploide Zellen imitieren, sondern eindeutig von singulären Ereignissen unterschieden werden können. Zu diesem Zweck wurde bei der Datenverarbeitung das Weiten- gegen das Flächensignal aufgetragen. Durch ein adäquates „*Gating*“, d.h. der Definition einer bestimmten Zielpopulation als Region, kann nun die Betrachtung weiterer Merkmale unter Ausschluss von nicht vereinzelter Zellen und Zelltrümmern erfolgen. Dabei kommen entweder weitere *Dot*-Plots zum Einsatz, z.B. zur Proliferationsanalyse einer zweiparametrischen DNA-Messung oder ein

Histogramm, die Auftragung nur eines Parameters auf der x-Achse gegen die Anzahl der Ereignisse auf der y-Achse und damit der Beschreibung des Zellzyklusstadiums (56)

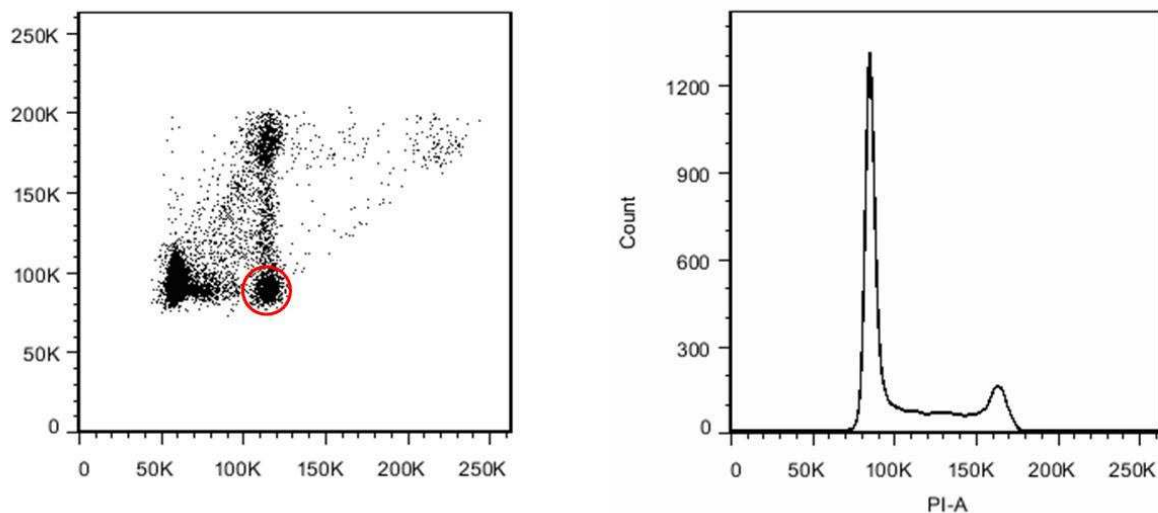


Abbildung 8: Dot-Plot mit Markierung der G₀-Zellen im Gate und Histogramm von mit DMSO behandelten BT474 Zellen (58)

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden mit Hilfe der Software *FACSDiva 6.1.1* (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) an einem mit dem Betriebssystem Windows XP kompatiblen Computer durchgeführt. Die Daten wurden sowohl als *list-mode* Datenfile FCS 2.0 als auch als FCS 3.0 (*Flow Cytometry Standard 2.0* bzw. 3.0) gespeichert und an einem Standardcomputer weiter bearbeitet. Die zweiparametrischen Messungen zur Zellzyklusverteilung und zur Apoptosebestimmung wurden anschließend mit der Software *FlowJo* Version 7.6.1. (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) ausgewertet.

2.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ZELLZYKLUSANALYSE

2.2.1 Der Zellzyklus

1953 postulierten Howard und Pelc das bis heute gültige Konzept von der eukaryotischen Zellteilung, die sich demnach in die vier aufeinander folgenden Phasen G₁-, Synthese, G₂- und Metaphase gliedert (59). Die Zellteilung (Zytokinese) selbst erfolgt in der lichtmikroskopisch sichtbaren Metaphase, nachdem eine vollständige Verdopplung des Genoms in der Synthesephase stattgefunden hat. G₁- und G₂-Phase, die der M- bzw. der S-Phase vorgeschaltet sind, dienen dabei als Vorbereitung auf die nachstehenden Aufgaben im Zellzyklus und werden zusammen mit der S-Phase zur Interphase zusammengefasst (60).

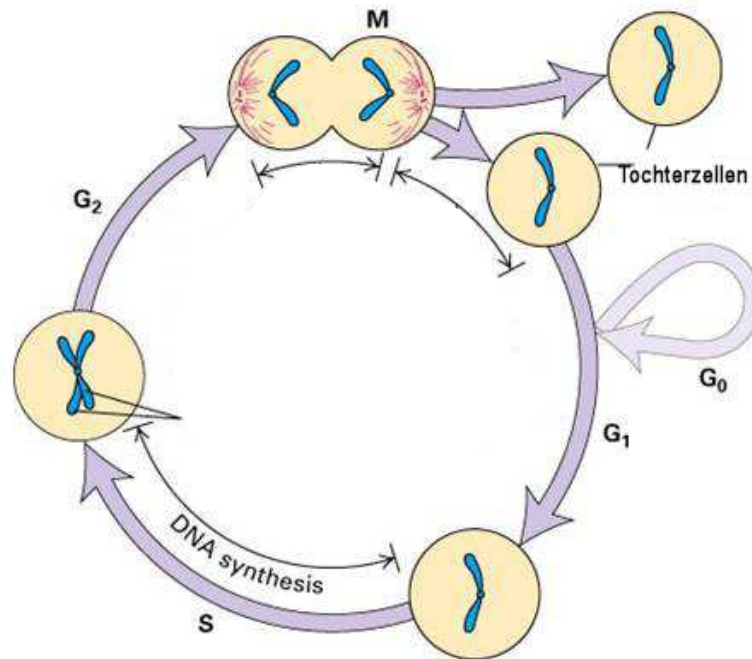


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Zellzyklusphasen (61)

Die strenge Regulation der Mitoseaktivität über externe und interne Kontrollmechanismen ist für multizelluläre Organismen und komplexe Gewebe von entscheidender Bedeutung. An diskreten Punkten des Zellzyklus erfolgt so unter Berücksichtigung aktivierender und inhibierender Signale die Entscheidung über das Fortschreiten im Teilungsprozess. Ein wichtiger Kontrollpunkt, der so genannte Restriktionspunkt, ist beispielsweise in der frühen G₁-Phase lokalisiert und wird beeinflusst durch mitogene und anti-mitogene Signale (TGF- β , Zellschädigung) (60). In Gegenwart von Wachstumsfaktoren wird die Zellvermehrung von Säugerzellen gewährleistet. Fehlende Stimuli oder ein Mangel an Nährstoffen etwa hingegen versetzen Zellen in den Ruhezustand, die G₀-Phase, in der keine Beteiligung an den Stationen der Zellteilung mehr vorliegt und die metabolische Aktivität deutlich reduziert ist (56). Nicht nur der Übertritt in die G₀-Phase, sondern auch Gewebsdifferenzierung kann zur Quieszenz und einem irreversiblen Verlust der Teilungsfähigkeit führen. Manche ruhenden Zellen jedoch können mit Hilfe von Wachstumsfaktoren, die als Kompetenzfaktoren wirken, wieder in das zyklische Geschehen der Zellteilung eingebracht werden (56). Einer weiteren Kontrolle unterliegen die Zellen in der G₂-Phase, die aufgrund ihrer Kürze zur G₂/M-Phase zusammengefasst wird. Hier wird geprüft, ob die S-Phase vollständig abgeschlossen worden ist. Während der Mitose ist ein weiterer Kontrollpunkt von zentraler Bedeutung, der die korrekte Anlagerung der Chromosomen an die Mitosespindel und ihre korrekte Verteilung auf die Tochterzellen gewährleistet (56;60).

2.2.2 Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik

Die BrdU/Hoechst-Quenching Technik als dynamische Proliferationsanalyse ermöglicht Untersuchungen über die Zellzykluskinetik bestimmter Zellpopulationen. Grundlage dieser Technik ist die kontinuierliche Exposition der Zellen gegenüber dem Nucleotidanalogen BrdU,

das in den S-Phasen der jeweiligen Zellzyklen anstelle der Base Thymidin in die Doppelhelix eingebaut wird (56). Zusätzlich nötig ist der simultane Einsatz der DNA-Farbstoffe Hoechst33258 (Hoe) und Propidiumiodid (PI). Hoechst bindet dabei nichtinterkalierend an AT-Basenpaare und weist eine verminderte Fluoreszenzintensität auf, wenn BrdU an die DNA gebunden hat. Dieser Effekt wird als *Quenching* bezeichnet. Im Gegensatz hierzu ist PI ein DNA-interkalierender Farbstoff, dessen Fluoreszenz unabhängig von der Substitution durch BrdU mit zunehmendem DNA-Gehalt ansteigt. Eine zweidimensionale Auftragung der Fluoreszenzintensitäten von Hoechst auf der x-Achse gegen PI auf der y-Achse ermöglicht somit eine Identifikation von Subpopulationen asynchron proliferierender Zellen in bis zu drei aufeinander folgenden Zellzyklen (56). Die folgenden Abbildungen sollen den *Quenching*-Effekt auf den Farbstoff Hoechst unter UV-Lichtanregung im Verlauf von drei Zellzyklen verdeutlichen.

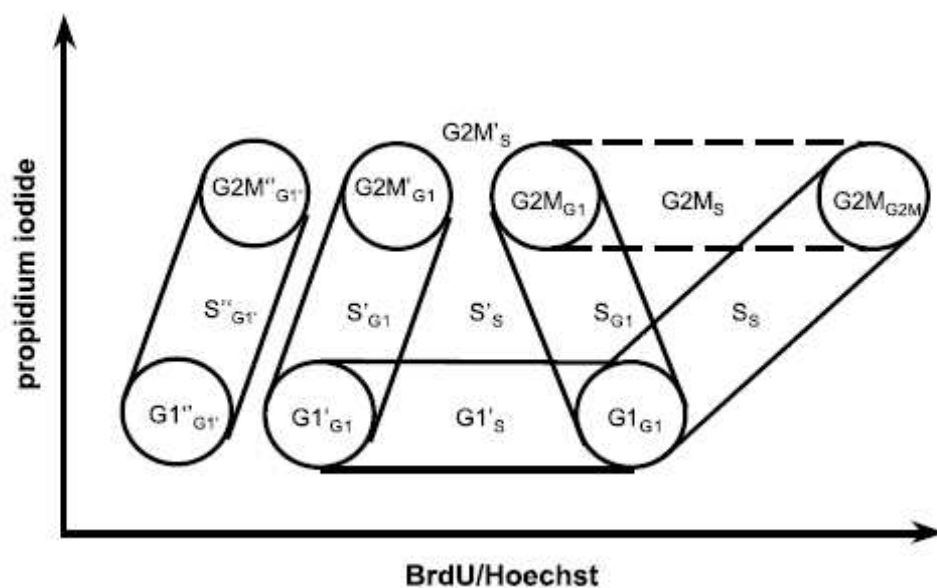


Abbildung 10: Bivariate Analyse der Fluoreszenzintensitäten von Hoechst33258 und PI im Verlauf von drei aufeinander folgenden Zellzyklen asynchron proliferierender Populationen bei kontinuierlicher BrdU-Exposition. Die Subskripte kennzeichnen die Ursprungszellzyklen (62)

Zum Zeitpunkt 0 h verhalten sich die Hoe- und PI-Fluoreszenzen linear proportional zueinander und die Zellen verteilen sich normal auf die Zyklusphasen G_1 , S und G_2M (siehe Abb.8: $G1_{G1}$, S_s , $G2M_{G2M}$). Nach der Zugabe des Analogons BrdU und seiner Einlagerung während der S-Phase kann nun im weiteren Verlauf des Zellzyklus eine Abnahme der Hoechst-Fluoreszenz beobachtet werden, d.h. sie wird *gequencht*. Gleichzeitig nimmt die PI-Fluoreszenz proportional zur Verdopplung des DNA-Gehalts während des ersten Zellzyklus zu, so dass sich insgesamt eine nach links verschobene Spur der Ausgangswerte ergibt. Die zum Abschluss des ersten Zellzyklus erfolgende Zellteilung bringt eine Halbierung des Gesamt-DNA-Gehalts und damit auch der Hoe- und PI- Fluoreszenz mit sich (siehe Abb.8: $G1'_{G1}$ und $G1'_s$). Im zweiten Zellzyklus erreicht die BrdU-Substitution mit einem Anstieg von 50% auf 75% allerdings nur eine prozentuale Steigerung um 25% und lässt damit den *Quenching*-Effekt von Hoechst geringer ausfallen. Es überwiegt ein durch die Zunahme des Gesamt-DNA-Gehalts bedingter Anstieg der Hoe-Farbstoffbindung gegenüber der BrdU-induzierten Verdrängung. Diese

Entwicklung hat zur Folge, dass ab dem zweiten Zellzyklus sämtliche nachfolgende Zellzyklen leicht nach rechts geneigt und parallel zueinander verlaufen, während der erste und der zweite Zellzyklus entlang einer gedachten Linie spiegelbildlich angeordnet sind. Erfahrungsgemäß verteilen sich die meisten Zellen nach 42 h auf den dritten Zellzyklus. Die Stärke der BrdU/Hoechst-*Quenching* Technik liegt nicht nur in einer umfangreichen Proliferationsanalyse, sondern auch in der Möglichkeit, ruhende Zellen, die so genannte G_0 -Phase-Fraktion, zu quantifizieren. Während sich alle teilenden Zellen nach einer Langzeitinkubation mit BrdU, z.B. nach 96 h, analog des Schemas in Abb.8 weiterentwickeln, verbleiben nicht proliferierende Zellen am Ausgangspunkt des ersten Zellzyklus und sind damit eindeutig als G_0 -Phase-Fraktion zu detektieren (siehe Abb.8: $G1_{G1}$) (56).

2.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE BESTIMMUNG APOPTOTISCHER ZELLEN

2.3.1 Die Apoptose

Multizelluläre Organismen verfügen über komplexe molekulare Mechanismen, die im Falle gravierender Zellschädigung oder Gefährdung für den Organismus den programmierten Zelltod einleiten können. In den meisten Fällen erfolgt dieser intrazelluläre Prozess durch die Apoptose, einem irreversiblen „Selbstmordprogramm“, das sich durch folgende morphologische Besonderheiten charakterisiert: Die Zellen schrumpfen, kondensieren und formen zahlreiche membranumschlossene apoptotische Körperchen, die rasch phagozytiert werden, bevor es zu einer Zerstreuung zytoplasmatischer Inhalte kommen kann. Ganz im Gegensatz hierzu ruft die Zellnekrose, das traumatische und unkontrollierte Zellsterben, durch Zellschwellung und -zerreißung eine Entzündungsreaktion seiner Umgebung hervor. Tumorzellen entwickeln meist eine abnorme Regulation ihres apoptotischen Programms, was den erheblichen Beitrag der Apoptose zur Karzinogenese veranschaulicht. Die Apoptose wird von einer Proteasenfamilie, den Caspasen, induziert, die als inaktive Vorläufer, als so genannte Procaspasen, in der Zelle vorhanden sind und durch gegenseitiges Schneiden sich selbst und damit eine proteolytische Kaskade aktivieren. So wird das Signal zum Zelltod amplifiziert und der Vorgang irreversibel eingeleitet. Einige Exekutorkaspasen richten sich gegen spezifische Zielproteine wie die Kernlamina, die DNA, Zytoskelettbestandteile oder Zell-Zell-Adhäsionsproteine und helfen somit, die zugrunde gegangene Zelle rund und leicht phagozytierbar zu machen. Die zur Apoptose führende Aktivierungskaskade kann auf mindestens zweierlei Arten ausgelöst werden. Einerseits kann Ligandenbindung an den zur TNF-Familie gehörigen Fas-Rezeptor das Todessignal über die Rekrutierung so genannter DISCs (*death inducing signaling complexes*) über Prokaspase 8 und 10 initiieren und fungiert damit als extrinsischer Signalweg. Andererseits kann das Apoptoseprogramm auch innerhalb der Zelle bei jeder Art von Stress, wie z.B. DNA-Schädigung oder Sauerstoffmangel, abgerufen werden. Dieser intrinsische Signalweg nimmt beispielsweise seinen Ursprung vom Tumorsuppressorprotein p53. Hierbei verläuft der Signalweg über die Freisetzung des Schlüsselproteins Cytochrom c aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien, der Oligomerisierung des Adapterproteins Apaf-1 zu einem Apoptosom und der letztendlichen

Komplexierung mit dem Initiatorprotein Procaspase 9. Um zu gewährleisten, dass Zellen nur zum Wohl des Gesamtorganismus ihr eigenes Sterben einleiten, unterliegen sämtliche Signalproteine einer strengen Kontrolle durch intra- und extrazelluläre Regulatorproteine. Anti-apoptotische (z.B. Bcl2 und Bcl-XL) und pro-apoptotische (z.B. Bax und Bak) Proteine der Bcl2 Familie kontrollieren die Freisetzung mitochondrialer Aktivatoren, während IAPs (*Inhibitors of apoptosis*) aktivierte Kaspasen inhibieren und deren Degradation veranlassen (63). Aufgrund der komplexen Struktur intrazellulärer apoptotischer Prozesse ergeben sich aus pharmakologischer Sicht multiple Angriffspunkte zur Modulation pro- und anti-apoptotischer Signale. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob es möglich ist, die abnorm regulierte Apoptose bei den Tumorzelllinien BT474 und SK-BR-3 mit Hilfe verschiedener Zytostatika und deren Kombinationen zu induzieren und damit auch das Tumorstadium zu beeinflussen.

2.3.2 Die Annexin-V-FITC Messungen

Untersuchungen zum programmierten Zelltod bei mit Lapatinib, Trastuzumab, Pertuzumab und deren Kombinationen behandelten Zellen wurden durchflusszytometrisch mit Hilfe einer PI/Annexin-V-FITC Färbung durchgeführt (siehe Ergebnisse Kap. 3.3). Die beispielhaften *Density*-Plots einer unbehandelten und mit Camptothecin behandelten Probe der Zelllinie SK-BR-3 in Abb.10 zeigen eine Auftragung der Fluoreszenzintensität von PI auf der y-Achse gegen die Fluoreszenzintensität von FITC auf der x-Achse und gleichzeitig eine Unterteilung der Abbildung in vier Quadranten.

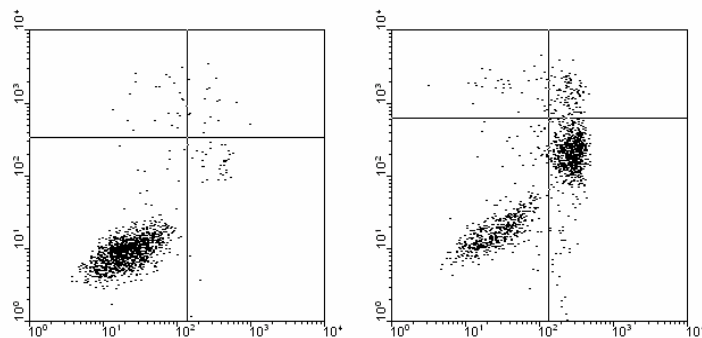


Abbildung 11: Annexin-V-FITC Messung einer unbehandelten (links) und mit Camptothecin behandelten (rechts) SK-BR-3 Probe; entnommen aus (64)

Im frühen Stadium der Apoptose brechen Zellen die asymmetrische Verteilung der Phospholipide ihrer Zellmembran auf und verlagern das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) von der Zytosol zugewandten Seite auf die Membranaußenseite. Dadurch werden vermutlich Makrophagen zur schnellen Phagozytose angelockt, um eine Gewebsschädigung durch Zelllyse zu vermeiden (65). Annexin-V weist eine hohe Affinität zu Phospholipidspezies wie z.B. PS auf und bindet es Calcium-abhängig. Bei nekrotischen Zellen hingegen geht die Intaktheit der Zellmembran verloren und Bestandteile des Zellinneren treten aus. Die Diskriminierung apoptotischer von nekrotischen Zellen gelingt durch die gleichzeitige Anwendung von Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiertem Annexin-V und einem weiteren

Farbstoff, in diesem Fall PI, zum Ausschluss eines Lecks in der Zellmembran. Vitale, intakte Zellen sind negativ in Bezug auf beide Fluoreszenzen und finden sich im linken unteren Quadranten (vgl. Abb.10). Zellen im frühen Stadium der Apoptose werden aufgrund der Bindung von Annexin-V an PS auf der Membranaußenseite FITC positiv, ohne dass PI durch die Zellmembran hindurch an die DNA binden kann. Somit kommen sie im rechten unteren Quadranten zu liegen (vgl. Abb.10). Rechts oben befinden sich spätapoptotische und nekrotische Zellen mit einer positiven Fluoreszenz für beide Farbstoffe, da ihre Zellmembran permeabel für PI geworden ist (vgl. Abb.10) (65).

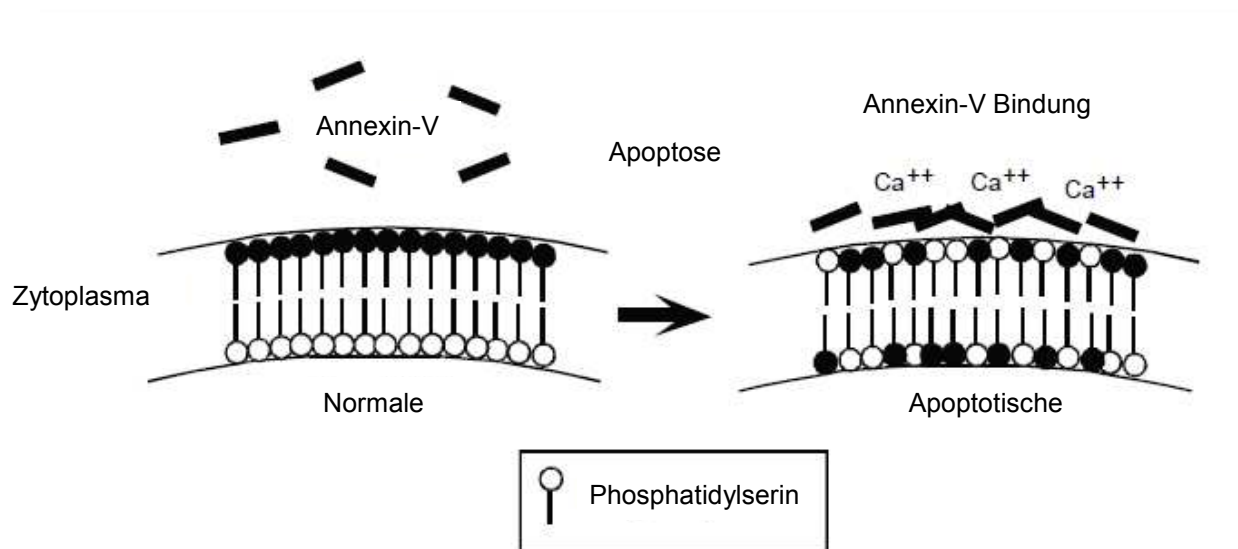


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Phospholipidveränderungen während der Apoptose und Annexin-V-Bindung; in Anlehnung an (66)

3 MATERIAL

3.1 UNTERSUCHTE ZELLINIEN

Allen Experimenten der vorliegenden Doktorarbeit ist gemeinsam, dass sie auf vergleichenden Untersuchungen zu den beiden Mammakarzinomzelllinien BT474 und SK-BR-3 beruhen. Frühere Analysen zu Wachstums- und Rezeptorverhalten haben deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien zu Tage gebracht. Demnach weisen BT474 Zellen eine deutlich kürzere Zellzyklusdauer auf als SK-BR-3 und treten unter EGF Stimulation verfrüht in die S-Phase ein, wohingegen sich bei SK-BR-3 bei gleicher Behandlung kein derartiger Stimulus finden lässt. Eine Behandlung mit Heregulin konnte dagegen in beiden Fällen einen sehr starken Zellzyklusprogress induzieren. Voraussetzung für die Betrachtung aller Ergebnisse ist die Berücksichtigung des unterschiedlichen spezifischen EGFR/c-erbB2-Koexpressionsmusters von BT474 und SK-BR-3. Beiden Zelllinien gemeinsam ist ein identisch hoher Gehalt an überexprimierten c-erbB2 Rezeptoren in der Größenordnung von 7×10^5 Rezeptoren pro Zelle. Ein gravierender Unterschied findet sich jedoch im Expressionsverhalten des EGF-Rezeptors. Während das Expressionslevel in BT474 Zellen bei 7×10^4 Rezeptoren pro Zelle liegt, finden sich in SK-BR-3 Zellen $2,2 \times 10^5$ und damit dreimal so viele Rezeptoren auf der Zellmatrix. Die Rezeptordichte von c-erbB3 und c-erbB4 hingegen ist in beiden Zelllinien etwa gleich niedrig und rangiert in einer Größenordnung von 1×10^4 Rezeptoren pro Zelle (67).

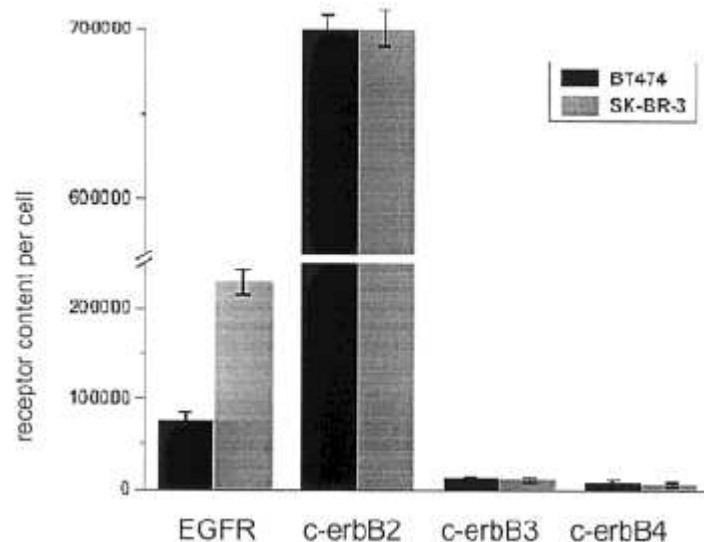


Abbildung 13: Rezeptorquantifizierung von EGFR, c-erbB2, c-erbB3 und c-erbB4 in BT474 und SK-BR-3 Brustkrebszellen (67)

Der Gehalt an c-erbB2 (7×10^5), c-erbB3 und c-erbB4 (1×10^4) ist ungefähr gleich hoch bzw. niedrig, ein deutlicher Unterschied findet sich jedoch beim EGFR, dessen Gehalt in SK-BR-3 Zellen ($2,2 \times 10^5$) um das Dreifache höher ist als in BT474 Zellen (7×10^4). Weiterhin gilt die

Zelllinie BT474 als sensitiver in Bezug auf eine Therapie mit dem Antikörper Trastuzumab, was u.a. ihrem niedrigen Gehalt an EGFR zugeschrieben wird. Ihr Ansprechen auf eine derartige Antikörperbehandlung fiel in G₀-Phase Messungen viermal stärker aus als bei SK-BR-3 Zellen (68). Eine Therapie mit Pertuzumab brachte für beide Zelllinien kaum Erfolg, in Kombination mit Trastuzumab hingegen eine Potenzierung des alleinigen Effekts von Trastuzumab (64).

Die Tumorzelllinie **SK-BR-3** wurde aus dem Pleuraerguss eines metastasierten Adenokarzinoms der Mamma einer 43-jährigen Frau isoliert (69). Histopathologisch gesehen erscheint der Chromosomensatz hypertri- bis hypotetraploid und der Differenzierungsgrad kann mit G2 bis G3 klassifiziert werden. Die Überexpression des Her2/neu-Rezeptors beruht molekularbiologisch auf einer Amplifikation des c-erbB2-Gens (64). In der Literatur wird der Zelllinie SK-BR-3 ein hoher Gehalt an Progesteronrezeptoren zugeschrieben (70), Aussagen in Bezug auf den Östrogenrezeptorgehalt fallen jedoch sehr unterschiedlich aus (70;71). **BT474** Zellen sind hypertetraploid und konnten aus einem soliden, invasiven duktalem Mammakarzinom einer 60-jährigen Frau isoliert werden (69). Ebenso wie SK-BR-3 weisen sie einen histologischen Differenzierungsgrad von G2 bis G3 auf und überexprimieren Her2/neu auf der Zelloberfläche aufgrund einer c-erbB2-Genamplifikation (64). BT474 Mammakarzinomzellen werden als Progesteron- und Östrogenrezeptor positiv eingestuft (72).

3.2 MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

▪ DMEM	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
▪ DMSO	Merck, Darmstadt
▪ Einfriermedium	DMEM mit 10% FKS und 10% DMSO
▪ FKS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
▪ PBS	Biochrom AG, Berlin
▪ Phenolrot	Biochrom AG, Berlin
▪ RPMI	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
▪ Trypsin mit EDTA	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

3.3 ANTIKÖRPER UND TYROSINKINASEINHIBITOREN

3.3.1 Primäre Antikörper

▪ FITC Annexin V (Kat. Nr. 556419)	BD Pharmingen™, San Jose, CA, USA
▪ <i>mouse anti-human</i> Anti-β-Tubulin (Clone TUB 2.1), monoklonal #T4026	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
▪ <i>rabbit</i> Anti-Actin, polyklonal #A 2066	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
▪ <i>rabbit anti-human</i> EGFR Antibody #2232, polyklonal	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA USA
▪ <i>rabbit anti-human</i> Phospho-AKT (Ser473) monoklonal #4060	Cell Signaling Technology, Inc., Beverly, MA, USA

- | | |
|---|--|
| ▪ <i>rabbit anti-human</i> Phospho-EGF
Rezeptor (Tyr1173), monoklonal #4407 | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |
| ▪ <i>rabbit anti-human</i> Phospho-Her2/ErbB2
(Tyr1221/1222), monoklonal #2243 | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |
| ▪ <i>rabbit anti-human</i> Phospho-p42/44
MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204),
monoklonal #4377 | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |
| ▪ Pertuzumab
(Stocklsg. 10mg/ml H ₂ O + 1,1% Benzylalkohol) | Genentech, South San Francisco, CA, USA |
| ▪ Trastuzumab (Herceptin TM)
(Stocklsg. 10mg/ml H ₂ O + 1,1% Benzylalkohol) | Genentech, South San Francisco, CA, USA |

3.3.2 Sekundäre Antikörper

- | | |
|---|--|
| ▪ <i>goat anti-mouse</i> IgG,
<i>HRP-linked antibody</i> , polyklonal #7076 | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |
| ▪ <i>goat anti-rabbit</i> IgG,
<i>HRP-linked antibody</i> , polyklonal #7074 | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |

3.3.3 Tyrosinkinaseinhibitoren

- | | |
|---|--------------------------|
| ▪ Lapatinib GW 570216
(Stocklsg. 25mg/ml in 0,1% DMSO) | GlaxoSmithKline, München |
|---|--------------------------|

3.4 DNA-FARBSTOFFE, ENZYME UND WACHSTUMSFAKTOREN

3.4.1 DNA-Farbstoffe

- | | |
|------------------|--|
| ▪ Hoechst33258 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| ▪ Propidiumiodid | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |

3.4.2 Enzyme

- | | |
|---------|--|
| ▪ RNase | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
|---------|--|

3.4.3 Wachstumsfaktoren

- | | |
|-----------|-------------------------|
| ▪ rhEGF | ImmunoTools, Friesoythe |
| ▪ rhHRGβ1 | ImmunoTools, Friesoythe |

3.5 GEBRAUCHSFERTIGE REAGENZIEN (*KITS*)

- | | |
|--|--------------------------------|
| ▪ <i>BCA-Protein-Assay-Kit</i> (Kat.Nr.: 23235) | Thermo Fisher Scientific, Bonn |
| ▪ ECL-plus Western Blotting
<i>Detection System</i> (Kat.Nr.: RPN2135) | GE Healthcare GmbH, Freiburg |

- | | |
|---|--|
| ▪ <i>Human Phospho-Kinase Array-Kit</i> (Kat.Nr.: ARY003) | R&D Systems GmbH, Wiesbaden
Nordenstadt |
|---|--|

3.6 REAGENZIEN UND CHEMIKALIEN

- | | |
|--|--|
| ▪ β -Mercaptoethanol | Merck, Darmstadt |
| ▪ 2'-Desoxycytidin
(Stocklsg. 5 mM in H ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
Deisenhofen |
| ▪ 5-Bromo-2'-desoxyuridin
(Stocklsg. 50 mM in H ₂ O) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| ▪ Acrylamid-Stammlösung (40%) | Merck, Darmstadt |
| ▪ APS | Merck, Darmstadt |
| ▪ Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| ▪ BSA | Biotest AG, Dreieich |
| ▪ CaCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| ▪ Camptothecin (2 mM) | MBL International Corporation |
| ▪ EDTA | Serva, Heidelberg |
| ▪ Ethanol | J.T. Baker, Deventer, Niederlande |
| ▪ Glycerin | Merck, Darmstadt |
| ▪ Glycin | AppliChem, Darmstadt |
| ▪ Igepal CA-630 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| ▪ Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| ▪ KCl | Roth, Karlsruhe |
| ▪ KH ₂ PO ₄ | Merck, Darmstadt |
| ▪ Lysepuffer 10x | Cell Signaling Technology, Inc.,
Beverly, MA, USA |
| ▪ Methanol | Merck, Darmstadt |
| ▪ MgCl ₂ | Merck, Darmstadt |
| ▪ NaCl | Merck, Darmstadt |
| ▪ Na ₂ HPO ₄ | Merck, Darmstadt |
| ▪ PMSF | AppliChem, Darmstadt |
| ▪ Page Ruler Prestained protein ladder | Fermentas, St. Leon-Rot |
| ▪ Precision Protein Standard | Biorad Laboratories GmbH, München |
| ▪ Protease Inhibitor Cocktail Tabletten | Roche Diagnostic, Mannheim |
| ▪ Salzsäure | Merck, Darmstadt |
| ▪ SDS | Merck, Darmstadt |
| ▪ TEMED | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |
| ▪ Tris | Merck, Darmstadt |
| ▪ Tween 20 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen |

3.7 PUFFER UND LÖSUNGEN

- Annexin-V-Bindungspuffer
 - 100nM Hepes (pH 7,4)
 - 1,4 M NaCl
 - 25 mM CaCl₂
- DNA-Wasch-Puffer
 - 100 mM Tris-HCl (pH 7,4)
 - 0,9% NaCl
 - 1 mM CaCl₂
 - 0,5 mM MgCl₂
 - 0,2% BSA (kurz vor Gebrauch zugeben)
- DNA-Permeabilisierungspuffer
 - 0,1% Igepal in DNA-Wasch-Puffer
- DNA-Färbepuffer
 - 477 µl DNA-Permeabilisierungspuffer
 - 20 µl RNase A (Stock 1 mg/ml, 50-100 Units/mg, Ek.: 40 µg/ml)
 - 2,4 µl Hoechst 33258 (Stock 1 mg/ml in H₂O, Ek.: 1,2 µg/ml)
- PBS
 - 137 mM NaCl
 - 6,5 mM Na₂HPO₄
 - 1,5 mM KH₂PO₄
 - 2,7 mM KCl
- TE-Puffer
 - 25 mM Tris-HCl (pH 7,6)
 - 1 mM EDTA
- Zusammensetzung des Polyacrylamidgels
- Sammelgel (4%-ig)
 - 2,97 ml H₂O_{dest}
 - 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
 - 100 µl SDS (10%)
 - 650 µl Acrylamid-Stammlösung (40%)
 - 25 µl APS (10%)
 - 5 µl TEMED
- Trenngel (7,5%-ig)
 - 5,465 ml H₂O_{dest}
 - 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)
 - 100 µl SDS (10%)
 - 1,875 ml Acrylamid-Stammlösung (40%)
 - 50 µl APS (10%)
 - 10 µl TEMED
- Reagenzien für Western-Blotting
- Anodenpuffer 1
 - 300 mM Tris-HCl (pH 10,4)
 - 20% Methanol
- Anodenpuffer 2
 - 25 mM Tris-HCl (pH 10,4)
 - 20% Methanol
- AP-Puffer 10×
 - 1 M Tris-HCl (pH 7,4)
 - 1 M NaCl
 - 25 mM MgCl₂
- AP-T-Puffer 1×
 - 0,1% Tween 20 in AP-Puffer 1x
- Electrophoresepuffer 5x
 - 125 mM Tris-HCl (pH 8,5)
 - 1,28 M Glycin
 - 1% SDS

- Kathodenpuffer
25 mM Tris-HCl (pH 7,6)
20% Methanol
40 mM ϵ -Amino-n-Caprinsäure (pH 7,6)
- PMSF-Stammlösung
100 mM in Isopropanol
- SDS-Probenpuffer 2x
0,125 M 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
4% SDS
0,004% 0,1% Bromphenolblau
20% Glycerin
10% β -Mercaptoethanol
- Strippingpuffer (pH 2,2)
15 g Glycin
1 g SDS
10 ml Tween 20
- Zelllysepuffer (1 ml)
100 μ l Lysepuffer 10x
142,9 μ l Protease Inhibitor Cocktail 7x
10 μ l PMSF
747,1 μ l H₂O

3.8 VERBRAUCHSMATERIAL

- FACSClean
BD Biosciences, Heidelberg
- FACSFlow: Trägerflüssigkeit
BD Biosciences, Heidelberg
- FACSRinse
BD Biosciences, Heidelberg
- FACSShutdown Solution
BD Biosciences, Heidelberg
- FACSWash
BD Biosciences, Heidelberg
- Glaspipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)
Brand GmbH + Co, Wertheim
- Gewebe-Kulturflasche T75 (250 ml)
BD Biosciences, Heidelberg
- Gewebe-Kulturflasche T175 (600 ml)
BD Biosciences, Heidelberg
- Gewebe-Kulturflasche T25 (50 ml)
BD Biosciences, Heidelberg
- Hyperfilm
Amersham Pharmacia Biotech, England
- Kryoröhrchen
Greiner, Solingen
- Mikrotiterplatten
Corning B.V. Life Sciences, Amsterdam, Niederlande
- Pasteurpipetten
VWR international GmbH, Darmstadt
- Pipettenspitzen (10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l)
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
- Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml
Falcon, Heidelberg
- PVDF-Membran
Roche Diagnostics, Mannheim
- Reaktionsgefäße 1,5 ml & 2 ml
Eppendorf, Hamburg
- 6-well-Platten
Falcon-BD, Heidelberg
- Whatman Filterpapier
Laborcenter, Nürnberg
- Zellschaber
Greiner, Solingen
- Zentrifugenröhrchen (15 ml & 50 ml)
Greiner, Solingen

3.9 GERÄTE

▪ Blot-Apparatur Perfect Blue™, Semi-Dry' Electro Blotter Sedec™ M	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
▪ Brutschrank BD 6220	Heraeus Sepatech, Osterode
▪ Consort E455	Fröbel Labortechnik, Lindau
▪ Durchflusszytometer FACSCanto II	BD Biosciences, Heidelberg
▪ Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
▪ Einfriergerät <i>Qualifreeze</i>	LabWare Ltd., Cheshire, England
▪ Elektrophoresekammer: Mini-Protean <i>tetra cell</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
▪ Elisa-Reader: Emax <i>precision microtiter reader</i>	Molecular Devices, Ismaning
▪ Eppendorf-Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
▪ Glas-Platten (1 mm & <i>short plates</i>)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
▪ Gieß-Apparatur	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
▪ Magnetrührer RCT <i>basic</i>	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen
▪ Membran-Vakuum-Pumpe	Vacuumbrand GmbH + Co, Wertheim
▪ Lichtmikroskop Leitz, labovert FS	American Instrument Exchange Haverhill, MA, USA
▪ Mikroskop AxioCam MRc	Zeiss, Göttingen
▪ Milli Q <i>Water Systems</i>	Millipore S.S., Molsheim, Frankreich
▪ Neubauer-Zählkammer 0,100 nm	Brand GmbH + Co, Wertheim
▪ pH-Meter WTW pH522	Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH & Co., Weilheim
▪ Pipetus	Hirschmann, Laborgeräte, Eberstadt
▪ 37°C-Schrank	Heraeus Sepatech, Osterode
▪ Sterilbank LaminAir	Heraeus Sepatech, Osterode
▪ Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg
▪ Ultraschallgerät Branson Sonifier 450	G. Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
▪ Vortex REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
▪ Waage Sartorius <i>analytic</i>	Sartorius, Göttingen
▪ Wasserbad GFL 1083 Burgwedel	Gesellschaft für Labortechnik GmbH
▪ 10-well-Kämme (1 mm)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
▪ Western-Blot Kammer	Biometra, Göttingen
▪ Zellzähler	BaumerIVO, Villingen-Schwenningen
▪ Zentrifuge - Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Sepatech, Osterode
▪ Zentrifuge - centrifuge 5415R	Eppendorf-Netheler-Hiz, GmbH, Hamburg

-
- | | |
|-------------------------------|----------------------------|
| ▪ Zentrifuge - Megafuge 1,0 | Heraeus Sepatech, Osterode |
| ▪ Zentrifuge - Varifuge 3.2RS | Heraeus Sepatech, Osterode |

4 METHODEN

4.1 METHODEN DER ZELLKULTIVIERUNG UND -PRÄPARATION

4.1.1 Standardkultur

Die Brustkrebszelllinien BT474 und SK-BR-3 wurden als adhärent wachsende Monolayer in Gewebe-Kulturflaschen oder 6-well-Platten kultiviert und im Brutschrank bei 37°C, 0,5% CO₂-Gehalt, 20% O₂-Gehalt und gesättigter Luftfeuchtigkeit aufbewahrt. Die Inkubation erfolgte mit *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM), versetzt mit 5% fötalem Kälberserum (FKS) und 0,2% Phenolrot. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

▪ Ernten von Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Um steriles Arbeiten ohne eine Kontamination von Kulturen zu gewährleisten, wurden alle zellbiologischen Arbeitsschritte unter einer Sterilbank vollzogen. Zur Zellernte wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit vorher erwärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline, PBS*) gewaschen. Nach Entfernung des „Wasch-PBS“ konnten die adhärennten Zellen mit 0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Um optimale Bedingungen für die enzymatische Reaktion durch Trypsin zu gewährleisten, wurden die Flaschen für weitere 2 min zurück in den 37°C warmen Kulturschrank gestellt und die Reaktion anschließend durch die zweifache Menge an FKS-haltigem Medium abgestoppt. Die Zellen konnten nun in ein 50 ml Röhrchen überführt und bei 1200 rpm für drei Minuten abzentrifugiert werden. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und, falls weiter Zellen zur erneuten Aussaat nötig waren, konnte ihre Anzahl in einer Neubauer-Zählkammer mit einem Zellzählgerät bestimmt werden.

▪ Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen, die längerfristig eingefroren werden sollten, wurden nach der Ernte mit 0,25% Trypsin bei 1200 rpm für drei Minuten pelletiert, in kaltem Einfriermedium (DMEM mit je10% FKS und Dimethylsulfoxid) resuspendiert und mit der Endkonzentration 1 Mio Zellen/1 ml Medium in Kryoröhrchen überführt. Mit Hilfe des Einfriergeräts „Qualifreeze“ konnte man die Zellen langsam über vier Stunden auf -100°C abkühlen und in einen Tank mit flüssigem Stickstoff einlagern. Eingefrorene Zellen konnten wieder zurück in Kultur genommen werden, indem sie rasch in 37°C warmem Wasserbad erwärmt und in ein 15 ml Röhrchen mit Medium überführt wurden. Nach Abzentrifugation bei 1200 rpm für drei Minuten und Resuspension des Pellets in frischem Medium konnte die Aussaat in T25 Kulturflaschen erfolgen. Am nächsten Tag wurde dann ein Mediumwechsel vorgenommen und die Zellkultur wie oben beschrieben fortgeführt.

4.1.2 Zellkultur und -präparation für die BrdU/Hoechst-Quenching Messungen

Folgende Ansätze wurden sowohl für BT474 als auch für SK-BR-3 Zellen für die G₀-Phase Bestimmungen durchgeführt:

BT474 + SK-BR-3		Behandlung					
Ansatz	BrdU	DMSO	Lapatinib	Trastuzumab	Pertuzumab	EGF	HRGβ1
1	96 h	-	-	-	-	-	-
2	96 h	100 nM	-	-	-	-	-
3	96 h	-	-	10 (µg/ml)	-	-	-
4	96 h	-	-	-	10 (µg/ml)	-	-
5	96 h	-	-	10 (µg/ml)	-	30 ng/ml / 5 nM	-
6	96 h	-	-	10 (µg/ml)	-	-	39 ng/ml / 5 nM
7	96 h	-	-	-	10 (µg/ml)	30 ng/ml / 5 nM	-
8	96 h	-	-	-	10 (µg/ml)	-	39 ng/ml / 5 nM
9	96 h	-	100 nM	-	-	-	-
10	96 h	-	100 nM	-	-	30 ng/ml / 5 nM	-
11	96 h	-	100 nM	-	-	-	39 ng/ml / 5 nM
12	96 h	-	100 nM	10 (µg/ml)	-	30 ng/ml / 5 nM	-
13	96 h	-	100 nM	10 (µg/ml)	-	-	39 ng/ml / 5 nM
14	96 h	-	100 nM	-	10 (µg/ml)	30 ng/ml / 5 nM	-
15	96 h	-	100 nM	-	10 (µg/ml)	-	39 ng/ml / 5 nM
16	96 h	-	10 nM	-	-	-	-
17	96 h	-	10 nM	-	-	30 ng/ml / 5 nM	-
18	96 h	-	10 nM	-	-	-	39 ng/ml / 5 nM
19	96 h	-	10 nM	10 (µg/ml)	-	30 ng/ml / 5 nM	-
20	96 h	-	10 nM	10 (µg/ml)	-	-	39 ng/ml / 5 nM
21	96 h	-	10 nM	-	10 (µg/ml)	30 ng/ml / 5 nM	-
22	96 h	-	10 nM	-	10 (µg/ml)	-	39 ng/ml / 5 nM

Tabelle 3: Zellpräparation für die BrdU/Hoechst-Quenching Messungen

Die Stocklösung von 25 mg/ml Lapatinib wurde in DMSO so verdünnt, dass jeweils zwei neue Stocklösungen in der Konzentration 100 µM und 10 µM entstanden. Diese wurden in einer Verdünnung von 1:1000 zu den Zellen gegeben, so dass eine Endkonzentration von 100 nM bzw. 10 nM entstand. Am Tag 1 erfolgte die Aussaat von je 0,5 Mio BT474 bzw SK-BR-3 Zellen pro T75 Kulturflaschen in 10 ml DMEM und 5% FKS. Am Tag 4 wurden die vorbereiteten Kulturflaschen mit den in der Tabelle angegebenen Behandlungen in der jeweiligen Konzentration versetzt, wobei die Zugabe der Behandlungen in der Reihenfolge Trastuzumab und Pertuzumab als erstes, Lapatinib als zweites und EGF bzw. HRG als letztes erfolgte. Sechs Stunden später wurden die Kulturflaschen mit jeweils 120 µl 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) bzw. 2'-Desoxycytidin (DC) behandelt (62). DC dient der Vermeidung von durch BrdU eventuell induzierten Störungen des Nukleotidstoffwechsels (62). Am Tag 6 war ein weiterer Mediumwechsel und damit ein Nachlegen der Tyrosinkinaseinhibitoren, der anti-c-erbB2-Antikörper, der Wachstumsfaktoren und der Substanzen BrdU und DC nötig. Am Tag 8 ergab sich damit eine Expositionszeit aller Zellen gegenüber BrdU von 96 Stunden. Die zum Vergleich notwendigen unbehandelten Kontrollen wurden zeitgleich zu den behandelten Zellen ausgesät, mit BrdU und DC versetzt und geerntet. Die Ernte erfolgte – wie in der Zellkultur standardmäßig üblich – mit Trypsin. Zum Einfrieren der Zellen war ein weiterer Zentrifugationsschritt und eine Resuspension des Pellets in Einfriermedium – einer Kombination von RPMI-Medium (*Roosevelt Park Memorial Institute*) mit 10% DMSO und 10% FKS – nötig. Die geernteten Zellen konnten anschließend in einer Konzentration von 1 Mio Zellen / 1 ml Einfriermedium in Kryoröhrchen überführt und bei -20°C für die spätere FACS Messung aufbewahrt werden. Für die Färbung

wurden 0,5 Mio Zellen aufgetaut und anschließend zweimal mit DNA-Waschpuffer gewaschen. Nach einer fünfminütigen Abzentrifugation bei 1200 rpm und 4°C konnten die Pellets nun in 497 µl DNA-Färbepuffer aufgenommen und anschließend für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert werden. Die Zusammensetzung des DNA-Färbepuffers ergab sich pro Probe aus je 477 µl DNA-Permeabilisierungspuffer – der Kombination von BSA-haltigem DNA-Waschpuffer und 0,1% Igepal – 20 µl RNase A und jeweils 2,4 µl Hoe33258. Anschließend wurden 3 µl PI aus einer Stammlösung mit der Konzentration 0,25 mg/ml pro Färbeansatz zugegeben, erneut für mindestens 15 min auf Eis inkubiert und am Durchflusszytometer LSR II bzw. später auch am FACSCanto II bei einer Durchflussrate um 300 events/s gemessen.

4.1.3 Zellkultur und -präparation für die Reversibilitätsmessungen von Lapatinib

Untersuchungen zu der Fragestellung, ob der inhibitorische Effekt von Lapatinib reversibel ist, wurden nach folgenden Behandlungsschemata für beide Zelllinien durchgeführt:

BT474 + SK-BR-3		Behandlung	
Ansatz	BrdU	Lapatinib 10 nM	Lapatinib 100 nM
1	96 h	-	-
2	96 h	48 h	-
3	96 h	96 h	-
4	96 h	-	-
5	96 h	-	48 h
6	96 h	-	96 h

BT474 + SK-BR-3		Behandlung	
Ansatz ohne BrdU		Lapatinib 10 nM	Lapatinib 100 nM
1		-	-
2		48 h	-
3		96 h	-
4		-	-
5		-	48 h
6		-	96 h

Tabelle 4: Zellpräparation für die Reversibilitätsmessungen von Lapatinib

Grundsätzlich war das zellbiologische Vorgehen ähnlich gestaltet wie die Ansätze für die G₀-Phase Bestimmungen. Am Tag 1 wurden jeweils 0,5 Mio Zellen in T75 Flaschen ausgesät. Am Tag 4 erfolgte die Zugabe von Lapatinib in den unterschiedlichen Konzentrationen 100 nmol bzw. 10 nmol zu den für die 96 h-Behandlung vorgesehenen Kulturflaschen. Ebenso mussten alle Zellen mit BrdU und DC versetzt werden. Die Verwendung zweier Konzentrationen diente dabei der Untersuchung eventueller dosisabhängiger Effekte. Wie bei den G₀-Phase Bestimmungen musste Lapatinib am Tag 6 nach einem Mediumwechsel und der Erneuerung von BrdU und DC in der jeweiligen Konzentration nachgelegt werden. Ebenso konnte auch die Zugabe von Lapatinib in den jeweils vorgesehenen Konzentrationen für die 48 h-Behandlung vorgenommen werden. Somit ergaben sich für beide Konzentrationen jeweils zwei verschiedene Behandlungszeitpunkte: eine Inhibition über 48 h auf der einen Seite und auf der anderen Seite eine über 96 h anhaltende Exposition gegenüber dem dualen c-erbB1/c-erbB2

Tyrosinkinaseinhibitor. Gleichzeitig blieben jeweils zwei Kontrollansätze über die gleiche Wachstumsperiode völlig unbehandelt und erhielten nur BrdU und DC. Im Gegensatz zu den BrdU/Hoe-*Quenching* Versuchen wurden die Zellen jedoch nicht am Tag 8 geerntet, sondern erhielten nach Entfernung von Lapatinib aus dem Medium die Möglichkeit, bis zur Ernte am Tag 12 weiter proliferieren zu können. Durch diese Vorgehensweise konnte der Frage nachgegangen werden, ob sich erstens die Zellen nach einer Behandlung mit Lapatinib wieder regenerieren können und ob sich zweitens Unterschiede bei gleichem Vorgehen innerhalb der beiden Zelllinien finden lassen. Bei der Färbung und Messung wurde ebenso wie bei den G₀-Proben verfahren (vgl. Kap. 4.1.2).

Die zweite Behandlungsreihe unterscheidet sich in ihrem Aufbau nur in einem Punkt von der ersten Versuchsreihe, nämlich dem „Weglassen“ von BrdU und DC aus dem Medium. Somit konnte sichergestellt werden, dass eventuelle inhibitorische Effekte bei der Zellbehandlung nicht von der Substanz BrdU selbst herrührten. Diese Zellen wurden ausschließlich mit PI gefärbt und aus der einparametrischen Messung wurden die Daten für die S-Phase-Bestimmung gewonnen.

4.1.4 Zellkultur und -präparation für die Annexin-V-FITC Messungen

Für die Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen bei verschiedenen Inhibitoren und deren Kombinationen wurde folgendes Zellkulturschema für beide Zelllinien entworfen:

BT474 + SK-BR-3	Behandlung			
Ansatz	Lapatinib 10 nM	Pertuzumab 10 (µg/ml)	Trastuzumab 10 (µg/ml)	Camptothecin (10 µM)
1	-	-	-	
2	-	-	-	
3	-	-	-	
4				+
5	48 h			
6		48 h		
7			48 h	
8	48 h	48 h		
9	48 h		48 h	
10		48 h	48 h	
11	96 h			
12		96 h		
13			96 h	
14	96 h	96 h		
15	96 h		96 h	
16		96 h	96 h	

Tabelle 5: Zellpräparation für die Annexin-V-FITC Messungen

Am Tag 1 wurden jeweils 0,166 Mio SK-BR-3 und BT474 Zellen in T25-Zellkulturflaschen in 5 ml DMEM und 5% FKS ausgesät. Die therapeutische Antikörper- bzw. Tyrosinkinaseinhibitorbehandlung erfolgte dann am Tag 4 für die 96 h-Werte bzw. am Tag 6 für die 48 h-Behandlungen nach den in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen und Kombinationen. Für die 96 h-Behandlungen mussten am Tag 6 mit dem Medium auch die inhibitorischen Substanzen erneuert werden. Während die ersten drei Proben völlig unbehandelt blieben, dienten die vierten Ansätze beider Zelllinien als positive

Apoptosekontrollen und wurden jeweils einen Tag vor der Ernte für ca. 19 h mit der Apoptose induzierenden Substanz Camptothecin behandelt. Nach der Ernte mit Hilfe von Trypsin am Tag 8 wurden die Zellen ausgezählt, in kaltem PAB² (PBS/0,01%NaN₃/0,2%BSA) resuspendiert und auf Eis überführt. Anschließend konnten die Zellen folgendermaßen gefärbt werden: Je 1 Mio geerntete Zellen sollten zwei Mal in PAB² gewaschen und anschließend bei 4°C und 1200 rpm drei bis fünf Minuten abzentrifugiert werden. Alle Pellets waren anschließend in 100 µl des Annexin-V-Bindungspuffers zu resuspendieren und mit Ausnahme von Probe 2 wurden überall 5 µl Annexin-V-FITC hinzu pipettiert. Während Probe 1 ausschließlich in dem so hergestellten Annexin-V-Färbepuffer aufgenommen wurde, erhielten alle anderen Proben weitere 10 µl PI aus einer Stocklösung in der Konzentration 50 µg/ml. Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden weitere 400 µl Bindungspuffer zu allen Proben hinzugegeben. Durch die separate Färbung der Proben 1 und 2 ausschließlich mit FITC bzw. PI konnten die beiden Farbstoffe einzeln dargestellt und eine gegenseitige spektrale Überlappung von FITC und PI am FACSCanto II korrigiert werden. Die Färbung blieb für eine Stunde stabil.

4.1.5 Zellkultur und -präparation für die Gewinnung von denaturierten Proteinlysaten

Für die Lysatherstellung wurden 1 Mio SK-BR-3 und BT474 Zellen am Tag 1 in je 7 T75 Flaschen in DMEM mit 5% FKS ausgesät und am nächsten Tag nochmals mit dem gleichen Medium gefüttert. Am Tag 5 wurde das alte Medium abgesaugt, je zweimal mit PBS gespült und neues, FKS-freies Medium nachgelegt, um den Serumentzug zu garantieren. Einen Tag später konnten die Behandlungen nach folgendem Schema in die jeweiligen Flaschen pipettiert werden und über 24 Stunden bis zur Lyse am nächsten Tag ihre Wirkung entfalten:

BT474 + SK-BR-3 Ansatz	Behandlung		
	Lapatinib	Trastuzumab	Pertuzumab
1	-	-	-
2	100 nM	-	-
3	-	10 µg/ml	-
4	-	-	10 µg/ml
5	100 nM	10 µg/ml	-
6	100 nM	-	10 µg/ml
7	-	10 µg/ml	10 µg/ml

Tabelle 6: Zellpräparation für die Gewinnung von Lysaten

Nach siebentägigem Wachstum wurden die Zellen zur Ernte mindestens zweimal mit kaltem PBS gespült, wobei beim letzten Waschschrift die Kulturflasche mit einer Pasteurpipette gründlich abgesaugt werden musste. Anschließend wurden 129 µl Lysepuffer (vgl. Kap. 3.6) in den Kulturflaschenboden gegeben und die Flaschen für etwa 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen konnten nun mit einem Zellschaber vom Flaschenboden sorgfältig abgekratzt und die dadurch entstandene Suspension mit einer Pasteurpipette in ein ebenfalls auf Eis befindliches 1,5 ml-Cup überführt werden. Nachdem die Zellmembran so aufgeschlossen war, konnte die DNA der Proben mit Hilfe einer 10-sekündigen Ultraschallbehandlung (Geräteeinstellung *Duty Cycle* 65%, *Output Control* 5-6, Kühlung 4°C) aufgeschlossen und anschließend bei 16100 rpm

und 4°C über 15 bis 20 min abzentrifugiert werden. Der Überstand war nun in zwei bis drei weitere 1,5 ml Reaktionsgefäße zu aliquotieren und bei -80°C aufzubewahren. Das Pellet wurde hingegen verworfen.

4.2 PROTEINCHEMISCHE / IMMUNOLOGISCHE METHODEN

4.2.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Protein-Assay-Kit

Als Voraussetzung für den Western Blot ist eine Bestimmung der Proteinkonzentration der angefertigten Lysate nötig und wurde hier mit Hilfe des *BCA-Protein-Assay-Kits* von Pierce vorgenommen. Der Kit bedient sich der Biuretreaktion, einer Komplexbildung von Peptidbindungen mit Kupferionen in alkalischem Medium unter Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} , was in einem leicht bläulichen Farbumschlag resultiert. Anschließend cheliiert Bicinchoninsäure mit dem entstandenen Cu^{+} -Kation und formiert dabei einen stark violetten Farbkomplex, dessen Intensität zur Proteinkonzentration proportional ist und photometrisch erfasst werden kann (73). Zur Durchführung des Tests wurden je 10 µl des im Verhältnis 1:10 in TE-Puffer verdünnten Proteinlysats, des Proteinstandards (25-2000 µg/ml BSA in TE-Puffer) sowie 10 µl des bloßen TE-Puffers als Negativkontrolle auf eine Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend waren Lösung A (Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartat in 0,1 M Natriumhydroxid) und Lösung B (4% Kupfersulfat) im Verhältnis 1:50 zu mischen und davon 200 µl auf jedes Well zu geben. Nach kurzem Vortexen und einer Inkubationszeit von 30 min bei 37°C konnte mit Hilfe eines *ELISA-Readers* die Absorption gegen die Referenz bei 540 nm bestimmt werden. Die Proteinkonzentration in den zu analysierenden Proben konnte nun mit Hilfe einer Standard-Eichgeraden ermittelt werden.

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-Page*) und Western Blot

▪ Auftrennung von Proteinen durch *SDS-PAGE*

Durch die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*SDS-PAGE*) wird die Auftrennung des Proteingemisches auf Grund seines Molekulargewichts erreicht und die unidirektionale Laufrichtung vom Minus- zum Pluspol im quervernetzten Polyacrylamidgel durch die Zugabe von Natriumdodecylsulfat sichergestellt. Für die Elektrophorese kamen vertikale Minigele (8×12 cm) in einer Mini-Protean *tetra cell* Elektrophorese-Einheit der Firma Biorad zum Einsatz. Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde nach der von Laemmli beschriebenen Methode durchgeführt (74), wobei für die diskontinuierlichen Gele pH-Werte von 6,8 für das Sammelgel und 8,8 für das Trenngel verwendet wurden. Die Acrylamidkonzentrationen betrugen 4% bzw. 7,5% für Sammel- bzw Trenngel.

Die Gele wurden vor jeder Anwendung frisch gegossen. Die radikalische Polymerisation wurde unmittelbar vor dem Gießen der Gele durch Zugabe von APS (Ammoniumpersulfat) und TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) zu Acrylamidlösung in Tris-HCl-Puffer, SDS und

H₂O_{dest} gestartet. Nachdem die Gele auspolymerisiert waren, konnten sie in die Laufkammer eingespannt und mit 1×Elektrophoresepuffer überschichtet werden. Die Lysate wurden entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit SDS-Probenpuffer so gemischt, dass eine Gesamtkonzentration von 20 µg/lane entstand, anschließend für fünf Minuten bei 95°C aufgeköcht, kurz bei 13000 rpm abzentrifugiert und zusammen mit dem Molekulargewichtsstandard sorgfältig in jeweils eine Tasche des Gels pipettiert. Für die Laufzeit durch das Sammelgel wurde für jeweils zwei Gele eine Spannung von 80 V angelegt, die, nachdem die Laufront nach ca. 20 min an der Trenngrenze der beiden Gele angekommen war, auf 120 V für eine weitere Stunde erhöht werden konnte

▪ Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Western Blot)

„Western Blot“ umschreibt eine Methode, bei der die im SDS-Gel enthaltenen Proteine elektrophoretisch auf eine Membran aus Polyvinylidendifluorid (PVDF) überführt werden, indem das fertige SDS-Gel und die Membran zwischen mehreren Lagen von mit Puffer durchtränkten Whatmanfilterpapieren eingelegt werden. Diese Verfahrensweise wird auch als „Semi-Trocken-Blotting“ bezeichnet. Dieser Stapel befindet sich dann als Ganzes zwischen zwei Flächenelektroden in der Blot Apparatur Sedec™ M der Firma Peqlab. Im Einzelnen wurde das Gel zunächst von den Glasplatten abgelöst, das Sammelgel abgetrennt und verworfen und das übrig gebliebene Trenngel für eine Minute in Kathodenpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde für ca. 15 sec in Methanol, anschließend weitere 2 min in H₂O_{dest} und danach wiederum ca. 5 min in Anodenpuffer II eingelegt, während sich je zwei Whatman-Papiere pro Membran in Anodenpuffer I, II und in Kathodenpuffer für wenige Minuten befanden. Auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur wurden nun die verschiedenen Schichten des Blots in folgender Anordnung aufeinandergelegt:

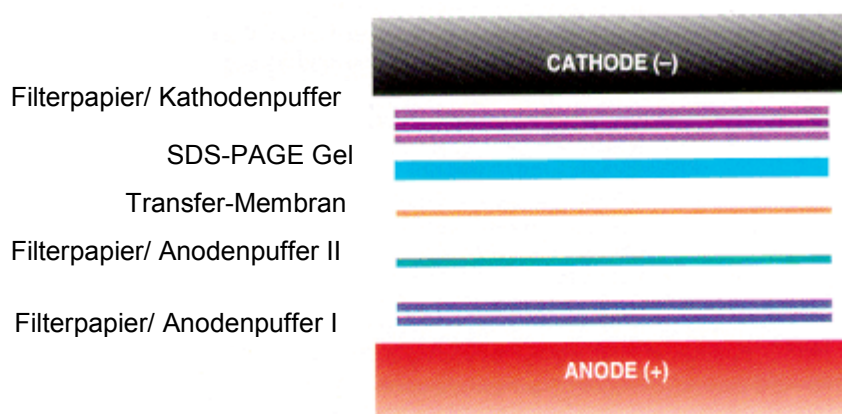


Abbildung 14: Anordnung der "Semi-Trocken-Blotting" Technik; in Anlehnung an (75)

Der Stapel wurde abschließend mit einem Falcontube zur Entfernung eventueller Luftblasen ausgewalzt und mit der Kathodenplatte bedeckt. Für eine Stunde wurde an die Blot-Apparatur nun eine Spannung von 60 mA pro Gel angelegt und nach Ablauf der Zeit die Übertragung des Standards überprüft.

▪ Immunchemischer Nachweis von Proteinen durch Chemolumineszenz

Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran wurde diese zur Blockierung freier und unspezifischer Bindungsstellen in einer Lösung aus 2% BSA in APT-Puffer (Blockierungslösung) über eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler belassen. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper wurde die Membran anschließend vollständig mit 3 ml eines Gemisches aus dem jeweiligen primären Antikörper und der Blockierungslösung in der entsprechenden Verdünnung über Nacht bei 4°C bedeckt (*mouse anti-human* Anti- β -Tubulin 1:1000, *rabbit anti-Actin* 1:4000, *rabbit anti-human* EGFR Antibody 1:1000, *rabbit anti-human* Phospho-AKT (Ser473) 1:1000, *rabbit anti-human* Phospho-EGF Rezeptor (Tyr1173) 1:1000, *rabbit anti-human* Phospho-Her2/ErbB2 (Tyr1221/1222) 1:1000, *rabbit anti-human* Phospho-p42/44 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) 1:3000). Am nächsten Tag war zum Entfernen des überschüssigen und ungebundenen Antikörpers ein dreimaliger Waschschrift über jeweils 10 min mit APT-Puffer notwendig. Danach konnte der sekundäre Antikörper (*goat anti-rabbit* IgG und *goat anti-mouse* IgG, *HRP-linked antibody* in APT-Puffer 1:2000) wiederum als 3 ml in APT-Puffer verdünntes Gemisch auf die Membran gegeben und für mindestens 1 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Erneut musste nun wieder überschüssiger und ungebundener sekundärer Antikörper durch wiederholtes Waschen mit APT-Puffer entfernt werden. Zur Detektion der gesuchten Proteine kam das ECL (*enhanced chemoluminescence*)-System von Amersham zum Einsatz, dessen beide Flüssigkeitskomponenten in einem Verhältnis von 1:1 gemischt werden und davon 2 ml über 1 min auf der Membran verweilen mussten. Dabei oxidiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase unter Katalyse von H_2O_2 das zyklische Diacylhydrazin Luminol und führt so zur Freisetzung von Licht. Nach Ablauf der Einwirkzeit konnte man die Detektionslösung für den Antigen-Antikörperkomplex von der Membran runterlaufen lassen und die Membran anschließend mit der Proteinseite nach oben zwischen zwei saubere durchsichtige Folien luftblasenfrei einlegen und mittels einer Sequenziermappe in die Dunkelkammer transportieren. Dort wurde auf die trockene Folie ein Röntgenfilm aufgelegt und die Expositionszeit der jeweiligen Signalstärke angepasst. War eine erneute Detektion von Antigenen auf der gleichen Membran erforderlich, konnte mit Hilfe eines Membranstrippings durch zweimal zehnmütiges Einlegen in *Strippingpuffer* der gebundene Antigen-Antikörperkomplex von der Membran entfernt werden. Nach einem dreimaligen Waschvorgang in APT-Puffer für jeweils zehn Minuten zur Entfernung des auf der Membran verbliebenen *Strippingpuffers* konnte wiederholt für eine Stunde mit 2% BSA in APT bei Raumtemperatur blockiert und die Detektionsprozedur von vorne begonnen werden.

4.2.3 *Proteome Profiler*TM Array zur Detektion von phosphorylierten Proteinen

Der *Human Phospho-Kinase Array Kit* von R&D erlaubt die parallele Detektion von 46 Kinase-Phosphorylierungsstellen und lässt somit Rückschlüsse über das relative Phosphorylierungsniveau von Proteinen zu, ohne eine Vielzahl von Western Blots erforderlich zu machen. Analog zur Antigen-Antikörperreaktion beim Western Blot befanden sich auf je zwei Nitrozellulosemembranen die kontroll- und proteinspezifischen Antikörper, an die die im Lysat enthaltenen entsprechenden phosphorylierten Antigene während einer Inkubation über Nacht

bei 2-8°C binden sollten. Für die Positivkontrollen wurden keine weiteren Angaben vom Hersteller genannt, für die Negativkontrollen wurde auf PBS zurückgegriffen. Jedes Antigen wurde in zweifacher Ausführung exakt untereinander auf der Membran aufgespottet. Ebenso wie beim Western Blot war zuvor eine Blockierung der Membranen in spezieller Blockierungslösung und eine Verdünnung der auf die Membran zu gebenden Proteine in der Blockierungslösung nötig. Bezüglich der Proteinmenge empfahl der Hersteller Konzentrationen von 100-500 µg/ml pro Membran – in unserem Fall wurden für jede Probe und Membran 170 µg Protein eingesetzt. Der *Array* wurde anschließend gewaschen, um ungebundenes Lysat zu entfernen und mit einem Cocktail aus spezifischen biotinylierten Detektionsantikörpern für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Antikörperlösung kommt in seiner Funktion dem sekundären Antikörper gleich. Nach einem erneuten mehrfachen Waschgang konnte nun ein Streptavidin-HRP Reagenz auf jede Membran gegeben, für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und abermals mehrfach abgewaschen werden. In Kombination mit der Chemolumineszenz-Detektionslösung von Amersham konnte nun so der Sekundärantikörper sichtbar gemacht werden. Dieser brachte auf dem Detektionsfilm pro Antigen *Spots* zum Vorschein, deren Schwärzung der Menge an gebundenem phosphoryliertem Protein entsprach. Alle experimentellen Schritte wurden wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben durchgeführt und alle dafür nötigen Reagenzien entstammten dem *Kit*.

▪ Densitometrische Auswertung

Die Schwärzung der Banden auf dem Röntgenfilm wurde mit einem Densitometer als optische Dichte (OD) gemessen und mit dem Programm *Image Quant V5.2* aus dem Paket *IQ Solutions V1.31* (Amersham, Freiburg, Deutschland) ausgewertet. Für die Western Blots wurden die Banden der verschiedenen Spuren genau eingegrenzt. Die Software ermittelt die Summe der Intensitäten, die auf gleicher Höhe relativ zum festgelegten Bereich gemessen wurden und stellt diese Werte anschließend als *Peaks* im Verlauf der Gelspur dar. Mit Hilfe der Software lässt sich die Fläche unter den *Peaks* als Integral berechnen. Die den Phosphorylierungsgrad indizierenden Werte wurden auf den Gesamtproteingehalt (dargestellt durch Anti-Actin oder β-Tubulin) bezogen und auf die Kontrollwerte normiert, um vergleichende Aussagen über die Inhibition der Zellen treffen zu können. Für die Auswertung der Protein-Arrays wurden die jeweils auf gleicher Position befindlichen Protein-*Spots* durch exakt gleich große Kästchen genau umschlossen. Die Software mittelt die Schwärzung innerhalb der definierten Bereiche. Die so gewonnene Intensität der Schwärzung wurde um die Schwärzung der Kontroll-*Spots* korrigiert, bevor eine vergleichende Darstellung der Inhibition in Form eines Diagramms vorgenommen werden konnte.

5 ERGEBNISSE

5.1 BRDU/HOECHST-*QUENCHING* MESSUNGEN ZUR BESTIMMUNG DER WACHSTUMSFAKTOR-SPEZIFISCHEN KOMPENSATION VON ANTI-HER2-BEHANDLUNGEN

Die folgenden Daten zur Bestimmung der G_0 -Phase-Fraktion von BT474 und SK-BR-3 Zellen wurden aus mindestens zwei, meist jedoch aus drei oder mehreren unabhängigen Messreihen gemittelt, die nach dem in Kap. 4.1.2 beschriebenen Schema behandelt und gefärbt wurden. Die Standardabweichungen sind anhand der zugehörigen Fehlerindikatoren ersichtlich. Mit Sternchen versehene Balken im Diagramm kennzeichnen signifikante Unterschiede. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen, für alle mit Lapatinib behandelten Zellen wurden die Daten für die mit DMSO behandelten Zellen herangezogen. Berechnungsgrundlage für die Ermittlung signifikanter Unterschiede war der *student's t-test* mit Hilfe des Programms SPSS (IBM, Armonk, NY, USA). Für die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 wurde in Untersuchungen von Konecny et al. eine hohe Sensitivität aufgrund ihrer hohen c-erbB2-Expressionsdichte nachgewiesen. Für die IC_{50} wurden Werte zwischen $0,01 \mu M$ und $0,1 \mu M$ beschrieben (76) und für die Untersuchungen dieser Arbeit übernommen. Frühere Publikationen aus der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass der antiproliferative Effekt von Trastuzumab und Pertuzumab in erster Linie auf eine Quieszenz und weniger auf eine verlangsamte Proliferation der Zellen oder auf Apoptose zurückzuführen ist. Auch das unterschiedliche Koexpressionsmuster von EGFR und c-erbB2 in SK-BR-3 und BT474 Zellen und die bedeutsame Modulation der Zellinhibition durch EGF und Heregulin konnten die Wirkung der beiden Antikörper entscheidend mit beeinflussen (67;68). Vor diesem Hintergrund soll in dieser Arbeit das unterschiedliche Ansprechen der Zelllinien BT474 und SK-BR-3 auf Kombinationen von Trastuzumab bzw. Pertuzumab mit dem TKI Lapatinib in An- und Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und Heregulin ebenfalls durch Betrachtung des G_0 -Anteils untersucht werden. Als Kontrolle dienten, wie bereits erwähnt, sowohl unbehandelte als auch mit dem Lösungsmittel DMSO versetzte Zellen.

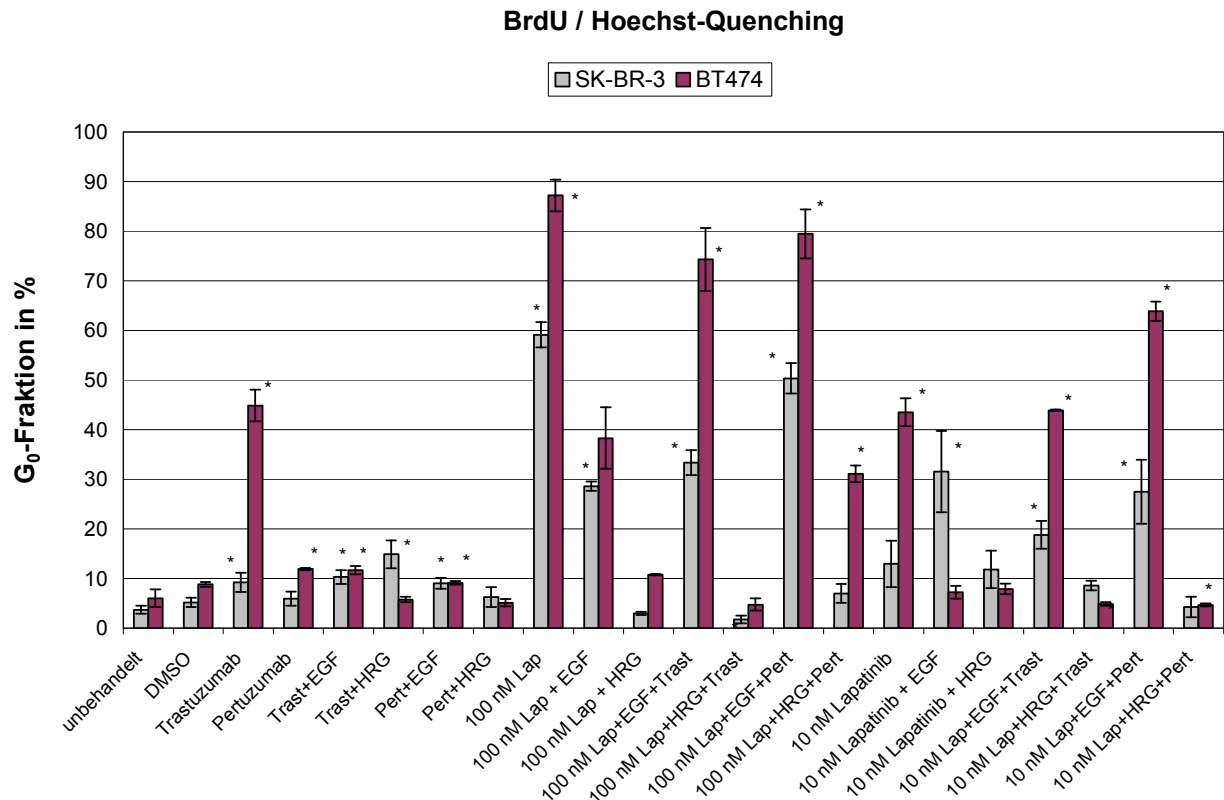


Diagramm 1: BrdU/Hoechst-Quenching für BT474 und SK-BR-3

■ Die BrdU/Hoechst-Quenching Versuche zur Zelllinie BT474

Der Anteil der G₀-Phase-Zellen bei der Zelllinie BT474 beträgt in unbehandeltem Zustand 6% und bleibt auch weiterhin unverändert in Anwesenheit von DMSO. Änderungen, die durch Pertuzumab alleine oder in Kombination mit EGF und Heregulin hervorgerufen werden, erweisen sich zwar statistisch gesehen zum Teil als signifikant, fallen aber dennoch nur geringfügig aus. Eine Behandlung mit Trastuzumab hingegen erzeugt einen Anstieg der G₀-Fraktion auf 45% und damit eine signifikante Erhöhung um das 7,5-fache ihres Ausgangswertes. Die gleichzeitige Gabe von EGF oder Heregulin zu Trastuzumab wiederum kann die Zellproliferationskapazität der BT474 Zellen wiederherstellen und den inhibitorischen Effekt von Trastuzumab reversieren. Trotzdem wurde auch für die Behandlung von Trastuzumab und EGF mit 12% ein signifikanter Wert errechnet. Wie an dem signifikant erhöhten, prozentualen G₀-Wert von 87% zu erkennen ist, erweist sich der TKI Lapatinib in der Konzentration von 100 nM als stärkster Zellzyklusinhibitor. Dennoch kann auch seine antiproliferative Kapazität durch die Anwesenheit von EGF partiell reduziert werden, was an der Verminderung der G₀-Phase-Zellen auf 38% ersichtlich ist. Die durch EGF ausgeübte Kompensation der durch Lapatinib induzierten Zellinhibition kann in BT474 Zellen durch den Einsatz beider monoklonaler Antikörper aufgehoben werden. Die Zugabe von Trastuzumab und Pertuzumab zu Lapatinib als zweite Inhibitoren bewirkt also eine Reversierung des Wachstumsfaktorstimulus durch EGF und erzielt mit einem G₀-Anteil von 74% bzw. 79% fast das Ausmaß der alleinigen Inhibition durch Lapatinib ohne den Einfluss von EGF. Auch hierbei

handelt es sich um statistisch signifikante Werte. Heregulin hingegen kann unabhängig von den eingesetzten Kombinationen und Konzentrationen jeden durch eine Anti-EGFR/Her2-Behandlung erreichten Zellzyklusarrest kompensieren. Dabei fällt der prozentuale Anteil der G_0 -Phase-Zellen bis auf das Niveau von unbehandelten Zellen zurück. Als einzige Ausnahme muss der kombinierte Behandlungsansatz von 100 nM Lapatinib, Pertuzumab und Heregulin erwähnt werden, in dem nur eine partielle Kompensation der Zellinhibition auf 31% erreicht wird, ein Wert, der sich aber weiterhin signifikant von der DMSO-Kontrolle unterscheidet. Wird die Konzentration von Lapatinib auf 10 nM reduziert, lassen sich bis auf wenige Unterschiede im Grunde dieselben Phänomene beobachten. Statt 87% treten nunmehr 43% der Zellen aus dem Zellzyklus in die G_0 -Phase ein. Auch dieser Wert bleibt gegenüber der DMSO-Behandlung signifikant erhöht. EGF und Heregulin reversieren in diesem Fall beide vollständig den von Lapatinib verursachten Anstieg der ruhenden Zellen. Erneut können die BT474 Mammakarzinomzellen durch eine zusätzliche Inhibition der mit Lapatinib vorbehandelten und mit EGF stimulierten Zellen durch Trastuzumab und Pertuzumab wieder signifikant in Quieszenz getrieben werden. Trastuzumab stellt trotz Stimulation durch EGF die von Lapatinib induzierte G_0 -Fraktion von 44% wieder her und Pertuzumab steigert den Anteil der nicht proliferierenden Zellen sogar bis auf 63%. Wie bereits erwähnt, lässt sich auch bei der niedrigeren Konzentration von Lapatinib der vollständige Kompensationsmechanismus von Heregulin durch keine Behandlung reversieren. Die statistische Berechnung ergibt sogar eine signifikante Änderung unter das Niveau von mit DMSO behandelten Zellen.

▪ Die BrdU/Hoechst-*Quenching* Versuche zur Zelllinie SK-BR-3

Bei SK-BR-3 befinden sich ca 4-5% der Zellen in unbehandeltem Zustand oder in Gegenwart von DMSO in Ruhe. Pertuzumab alleine oder in Kombination mit Heregulin kann keinen signifikanten Einfluss auf den Zellzyklusprogress der SK-BR-3 Zellen nehmen. Lediglich der Einfluss von Pertuzumab und EGF wurde als signifikant ermittelt, fällt aber mit 9% relativ gering aus. Auch der Effekt von Trastuzumab gilt als signifikant, kommt bei dieser Zelllinie aber nur wenig zum Tragen und erreicht mit 9% G_0 -Phase-Zellen nur ein Fünftel seines Wertes bei BT474 Zellen. Eine Kombination von Trastuzumab mit EGF oder Heregulin steigert signifikant die Anzahl nicht-proliferierender Zellen auf 10% bzw. 15%. Ganz im Gegensatz dazu erweist sich der TKI Lapatinib auch hier als stärkster Zellzyklusinhibitor und erhöht signifikant den Anteil der ruhenden Zellen auf 59%. Mit diesem Wert liegen SK-BR-3 Zellen allerdings deutlich unter dem entsprechenden Wert von 87% bei mit Lapatinib behandelten BT474 Zellen. Die partielle Kompensation des von Lapatinib induzierten Zellzyklusarrests durch eine Stimulation mit EGF lässt sich ebenfalls bei der Zelllinie SK-BR-3 reproduzieren: Auch hier können mit Hilfe von EGF etwa die Hälfte der ursprünglich durch Lapatinib inhibierten Zellen wieder in den Zellzyklus eingebracht werden, weitere 29% verbleiben in Ruhe. Eine signifikante Erhöhung arretierter Zellen bleibt damit erhalten. Bei dem Versuch einer Reversierung des durch EGF bedingten Kompensationsmechanismus ergibt sich bei SK-BR-3 ein deutlicher Unterschied zu BT474 in Bezug auf die Behandlung mit monoklonalen Antikörpern. Für die Zugabe beider Antikörper ergeben sich zwar weiterhin signifikant erhöhte G_0 -Phase-Werte, doch ganz im Gegensatz zur Zelllinie BT474, kann durch die zusätzliche Gabe von Trastuzumab kein weiterer inhibitorischer Effekt erzielt werden. Pertuzumab hingegen ist in der Lage, die von EGF auf die Inhibition von

Lapatinib ausgeübte Kompensation aufzuheben und den Prozentsatz nicht-proliferierender Zellen wieder auf 50% anzuheben. Heregulin kompensiert auch hier jede Zellzyklusinhibition durch Einzel- oder Kombinationsbehandlungen und bewegt sich dabei mit seinen G_0 -Werten auf dem Niveau völlig unbehandelter Zellen. Für die Behandlung mit 100 nM Lapatinib mit Trastuzumab und Heregulin ergibt sich sogar wieder eine signifikante Abnahme unter das mit DMSO behandelte Niveau. Effekte durch die niedrige Konzentration von Lapatinib kommen bei SK-BR-3 Zellen mit einer G_0 -Phase-Fraktion von 13% kaum zum Tragen, wiederum ganz im Gegensatz zur Situation, wie sie bei BT474 Zellen zu beobachten war. Werden 10 nM Lapatinib gleichzeitig mit EGF verabreicht, lässt sich spezifisch für SK-BR-3 Zellen eine besondere Beobachtung machen: Die G_0 -Phase-Zellen steigen auf signifikante 32% an und erfahren in der Behandlung mit dem Wachstumsfaktor EGF also eine zusätzliche Inhibition. Wie bei einer Konzentration von 100 nM Lapatinib bewirkt die Zugabe von Trastuzumab zu Lapatinib und EGF keinen weiteren inhibitorischen Stimulus. Der Anteil ruhender Zellen beträgt nur 19%, gilt aber noch als signifikant erhöht. Wird stattdessen Pertuzumab als dritte Substanz verwendet, erhält man eine G_0 -Phase-Fraktion von signifikanten 27%, die damit also wieder deutlich über dem Prozentsatz der entsprechenden Behandlung mit Trastuzumab liegt. Heregulin kompensiert auch in der Versuchsreihe mit 10 nM Lapatinib jeden zellinhibitorischen Effekt und unterliegt auch trotz der zusätzlichen Verwendung von monoklonalen Antikörpern keiner Reversierung.

Die Kernaussagen aus Diagramm 1 lassen sich für beide Zelllinien in folgender Tabelle zusammenfassen:

Vergleichende Betrachtung der BrdU/Hoechst-Quenching-Ergebnisse	
BT474	SK-BR-3
signifikanter G_0 -Exit durch Trastuzumab mit partieller und vollständiger Kompensation durch EGF und HRG ; nur geringfügige Inhibition durch Pertuzumab	signifikanter, aber geringer G_0 -Exit durch Trastuzumab , Steigerung mit EGF und HRG; keine signifikante Inhibition durch Pertuzumab ;
stärkste Zellzyklusinhibition durch 100 nM Lapatinib ; partielle und vollständige Kompensation durch EGF und HRG	stärkste, aber geringere Zellzyklusinhibition durch 100 nM Lapatinib ; partielle und vollständige Kompensation durch EGF und HRG
Reversierung des kompensatorischen Effekts von EGF , aber nicht von HRG, auf 100 nM Lapatinib durch Trastuzumab und Pertuzumab	Reversierung des kompensatorischen Effekts von EGF , aber nicht von HRG, auf 100 nM Lapatinib nur durch Pertuzumab , nicht durch Trastuzumab
signifikanter Zellzyklusarrest durch 10 nM Lapatinib ; vollständige Kompensation durch EGF und HRG; Reversierung der Kompensation durch EGF durch Trastuzumab und Pertuzumab	geringe Inhibition durch 10 nM Lapatinib ; weitere Inhibition durch EGF bzw. Pertuzumab und EGF

Tabelle 7: Vergleichende Betrachtung der Proliferationsuntersuchungen von BT474 und SK-BR-3 Zellen

5.2 DIE REVERSIBILITÄT DER DURCH LAPATINIB INDUZIERTEN ZELLINHIBITION BEI BT474 UND SK-BR-3

Die unterschiedliche Sensitivität von BT474 und SK-BR-3 Zellen gegenüber dem TKI Lapatinib wird unter Verwendung je zweier unterschiedlicher Expositionszeiten und Konzentrationen der Anti-Tumor-Substanz, wie in Kap. 4.1.3 erläutert, näher beleuchtet. Die Besonderheit der Reversibilitätsuntersuchung ergibt sich dadurch, dass Lapatinib zwar nach 96 h bzw. 48 h aus dem Medium entfernt wurde, die Ernte aber im Gegensatz zu den Proliferationsversuchen nach der „*Quenching* Methode“ erst nach weiteren 96 h erfolgte. Die Zellen erhielten so die Möglichkeit, sich im Anschluss an die Lapatinib-Behandlung eventuell zu „erholen“ und weiter proliferieren zu können. Besondere Berücksichtigung erfährt dabei die Fragestellung, ob die Effekte einer Behandlung mit Lapatinib über einen kürzeren und längeren Expositionszeitraum in Abhängigkeit von Zelllinie und Konzentration reversibel sind. Diese Betrachtungsweise soll weitere Aussagen über die Sensitivität und das Erholungspotential von BT474 und SK-BR-3 Zellen gestatten und eine Hilfestellung zur Findung einer jeweils geeigneten Konzentration von Lapatinib leisten. Diese Versuchsreihe wurde mit nur einer Messung durchgeführt. Die Interpretation der Ergebnisse soll anhand der G₀-Daten und der S-Phase-Fractionen erfolgen. Als Kontrolle dienten erneut unbehandelte Zellen, da ein eventueller Effekt von DMSO bereits in den BrdU/Hoechst-*Quenching* Messungen ausgeschlossen werden konnte.

5.2.1 Vergleichende Betrachtung von Zellinhibition und Erholungspotential bei BT474 und SK-BR-3 Zellen gegenüber 100 nM Lapatinib

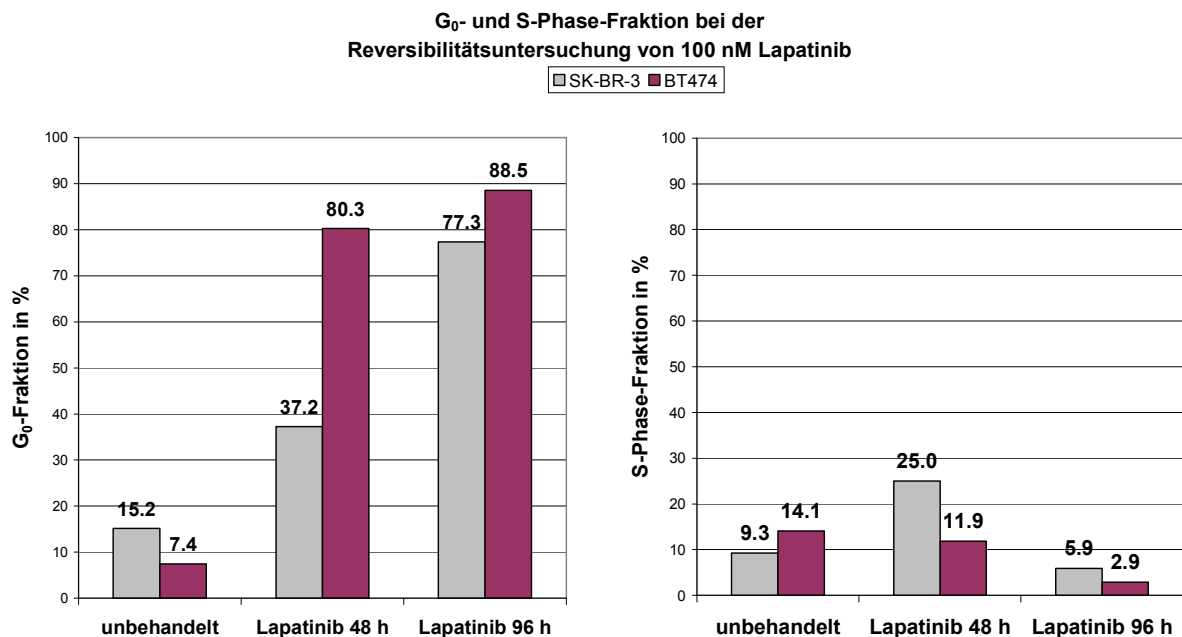


Diagramm 2: G₀-Werte und S-Phase-Fractionen für die Reversibilitätsuntersuchung von 100 nM bei BT474 und SK-BR-3

Bei BT474 steigt die Fraktion an G₀-Phase-Zellen bereits bei der 48-stündigen Expositionzeit gegenüber 100 nM Lapatinib von 7,4% auf 80,2% an und unterscheidet sich dabei nur geringfügig vom 96 h-Wert mit 88,5%. Die Zelllinie SK-BR-3 liefert im Hinblick auf die Fragestellung nach der Reversibilität von 100 nM Lapatinib andere Ergebnisse. Zwischen der kürzeren Expositionszeit und dem längeren Behandlungszeitraum zeichnet sich ein deutlicher Unterschied ab, denn mit zunehmender Länge der Behandlung erhöht sich auch der Anteil der nicht-proliferierenden Zellen. Befinden sich in unbehandeltem Zustand noch 15,2% der Zellen in Ruhe, so sind es nach 48 h Lapatinib-Exposition bereits mit 37,2% etwas mehr als doppelt so viele G₀-Zellen, die sich nach einer 96-stündigen Inhibition durch Lapatinib wiederum erneut auf 77% verdoppeln.

Nähere Einblicke in die Zellzykluskinetik der beiden Zelllinien erlaubt die vergleichende Untersuchung der zugehörigen S-Phase-Fractionen. Nach 48 h Lapatinib-Behandlung mit anschließender Regenerationsphase befinden sich mit ca. 12% nur geringfügig weniger BT474 Zellen in der S-Phase als in der zugehörigen Kontrolle mit 14%. Ein drastischer Unterschied zur Kontrolle zeichnet sich erst in einer 96-stündigen Behandlung ab, in der nur noch 3% der vorhandenen Zellen die S-Phase durchlaufen. Im Gegensatz dazu zeigen SK-BR-3 Zellen in der Regenerationsphase im Anschluss an die 48 h-Behandlung eine „überschießende“ Reaktion. Mit 25% befinden sich im Vergleich zur Kontrolle mit 9% deutlich mehr Zellen in der S-Phase. Der Anstieg der G₀-Phase-Zellen nach 96 h-Behandlung korreliert auch hier mit einem Abfall der S-Phase-Fraktion auf nunmehr 6%.

5.2.2 Vergleichende Betrachtung von Zellinhibition und Erholungspotential bei BT474 und SK-BR-3 Zellen gegenüber 10 nM Lapatinib

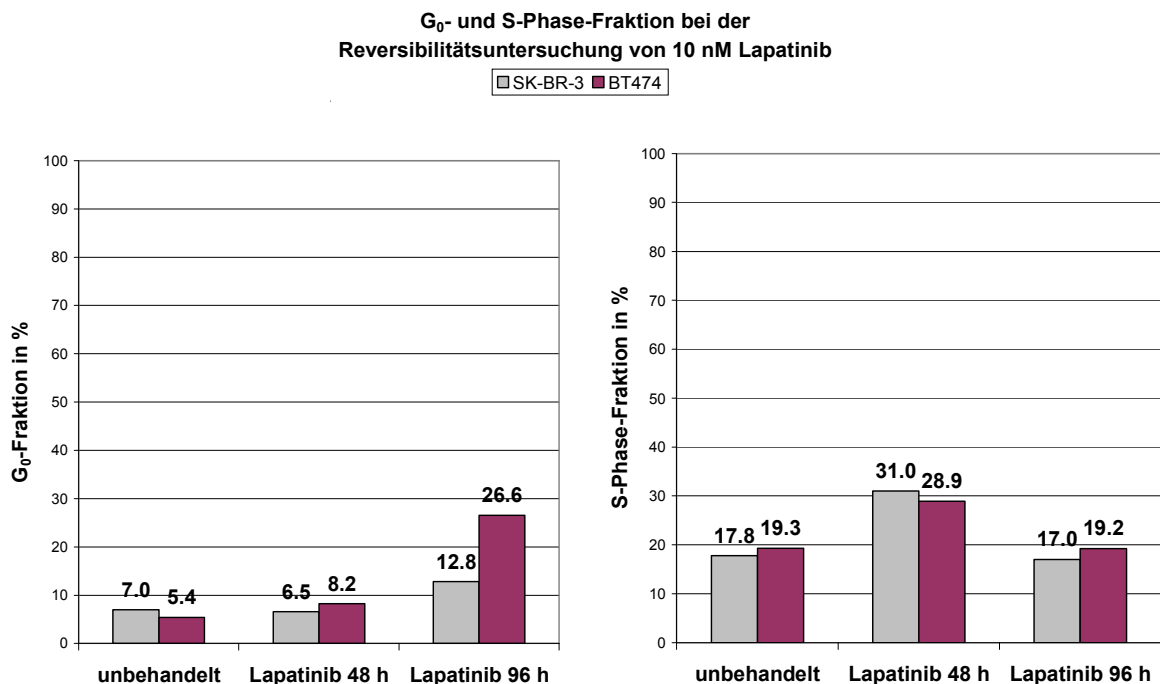


Diagramm 3: G₀-Werte und S-Phase-Fractionen für die Reversibilitätsuntersuchung von 10 nM bei BT474 und SK-BR-3

Wird anstelle von 100 nM die Konzentration von Lapatinib auf 10 nM reduziert, kann auch die Zelllinie BT474 die anschließende Regenerationsphase nutzen und erfährt im Vergleich zur Kontrolle nur einen sehr geringen Anstieg im Anteil der ruhenden Zellen – nämlich von 5,4% auf 8,2%. Der größte Gegensatz zur höher konzentrierten Versuchsreihe besteht nun in der weiteren Steigerung des Prozentsatzes an G₀-Phase-Zellen durch eine Verlängerung der Expositionszeit auf 96 h. Bei 100 nM ergaben sich hier dagegen kaum noch Unterschiede (vgl. Kap. 5.2.1). Mit 26,6% werden zwar deutlich mehr Zellen in Ruhe getrieben als bei der kürzer andauernden Lapatinib-Behandlung, allerdings handelt es sich hierbei um einen weitaus geringeren Effekt als es bei 100 nM Lapatinib der Fall war (vgl. Kap. 5.2.1). Werden SK-BR-3 durch 100 nM auch bei der kürzeren Expositionszeit deutlich inhibiert, liefert die Behandlung mit nur 10 nM unter gleichen Bedingungen keine vergleichbaren Ergebnisse. Die Anzahl an ruhenden Zellen entspricht mit 6,5% dem des Kontrollansatzes. Um eine Steigerung an in der G₀-Phase befindlichen Zellen zu erhalten, müssen auch SK-BR-3 Zellen über 96 h mit 10 nM behandelt werden. Mit 12,8% werden bei SK-BR-3 Zellen wieder deutlich weniger Zellen an der Proliferation gehindert als bei BT474 Zellen. Der Unterschied zu den 96 h Werten einer Behandlung mit 100 nM Lapatinib fällt ebenfalls noch größer aus als bei der Zelllinie BT474 (vgl. Kap. 5.2.1).

Auch hier können die jeweiligen S-Phase-Fractionen nähere Auskunft zur Zellzykluskinetik und dem Proliferationsverhalten nach Lapatinib-Exposition liefern. In Analogie zur niedrigen G₀-Fraktion nach nur 48-stündiger Behandlung mit 10 nM Lapatinib erhöht sich bei beiden

Zelllinien die SPF im Vergleich zur Kontrolle. Bei BT474 ist ein Anstieg von 19,3% auf 28,9% und bei SK-BR-3 eine sogar noch stärkere Zunahme von 17,8% auf 31% zu verzeichnen. Nach der länger andauernden Lapatinib-Behandlung weisen die SPF beider Zelllinien keine Unterschiede zur Kontrolle auf. Im Vergleich zur höheren Lapatinibkonzentration, bei der eine starke Zunahme im G_0 -Anteil und eine entsprechende Abnahme in der SPF zu verzeichnen war, bleiben die SPF also im Normbereich bei gleichzeitig nur mäßigem Anstieg der zugehörigen G_0 -Werte.

5.3 ANNEXIN-V-FITC MESSUNGEN ZUR APOPTOSEBESTIMMUNG BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN

Für die Evaluation des durch eine Behandlung mit den Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab und dem TKI Lapatinib induzierten Anteils an apoptotischen und nekrotischen Zellen dienen Annexin-V-FITC Messungen. Die theoretischen Grundlagen zur Datengewinnung und -verarbeitung über Quadrantenanalyse sowie der Zellpräparation sind in den Kapiteln 2.3.2 und 4.1.4 beschrieben. Für die Dauer der Zellbehandlung wurden erneut 48 h und 96 h ausgewählt. In Anbetracht des hohen G_0 -Exits unter 100 nanomolarer Lapatinib-Behandlung wurden die Apoptosemessungen mit der geringeren Lapatinib-Konzentration von 10 nM gestartet, um keine zu drastischen Zellschädigungen zu induzieren. Arbeitsgruppeninterne Vorarbeiten haben bereits das Apoptoseverhalten von BT474 und SK-BR-3 Zellen in Verbindung mit einer Antikörperbehandlung beschrieben (64). Nun soll die pro-apoptotische Potenz des erst seit wenigen Jahren für die Mammakarzinomtherapie zugelassenen Tyrosinkinaseinhibitors Lapatinib in der alleinigen oder auch in der mit den beiden Antikörpern kombinierten Anwendung genauer untersucht werden. Ein Vergleich der durch Behandlung mit Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib alleine oder deren Kombinationen erhaltenen Apoptosefraktionen mit der von unbehandelten Zellen soll so weitere Auskünfte über die zellbiologischen Prozesse während einer multimodal gestalteten Tumorthherapie vermitteln. Als Positivkontrolle dienten mit 10 μ M Camptothecin behandelte Zellen. Im Folgenden werden die Diagramme für die Absolutwerte und für die normierten Werte, bei denen der Kontrollwert gleich eins gesetzt wurde, abgebildet. Für eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Zelllinien beziehen sich die nachfolgenden Beschreibungen auf die normierte Abbildung. Die Daten zur Apoptosebestimmung wurden für BT474 Zellen aus zwei, für SK-BR-3 aus drei unabhängigen Messreihen gewonnen. Die Fehlerindikatoren geben die Standardabweichungen wider.

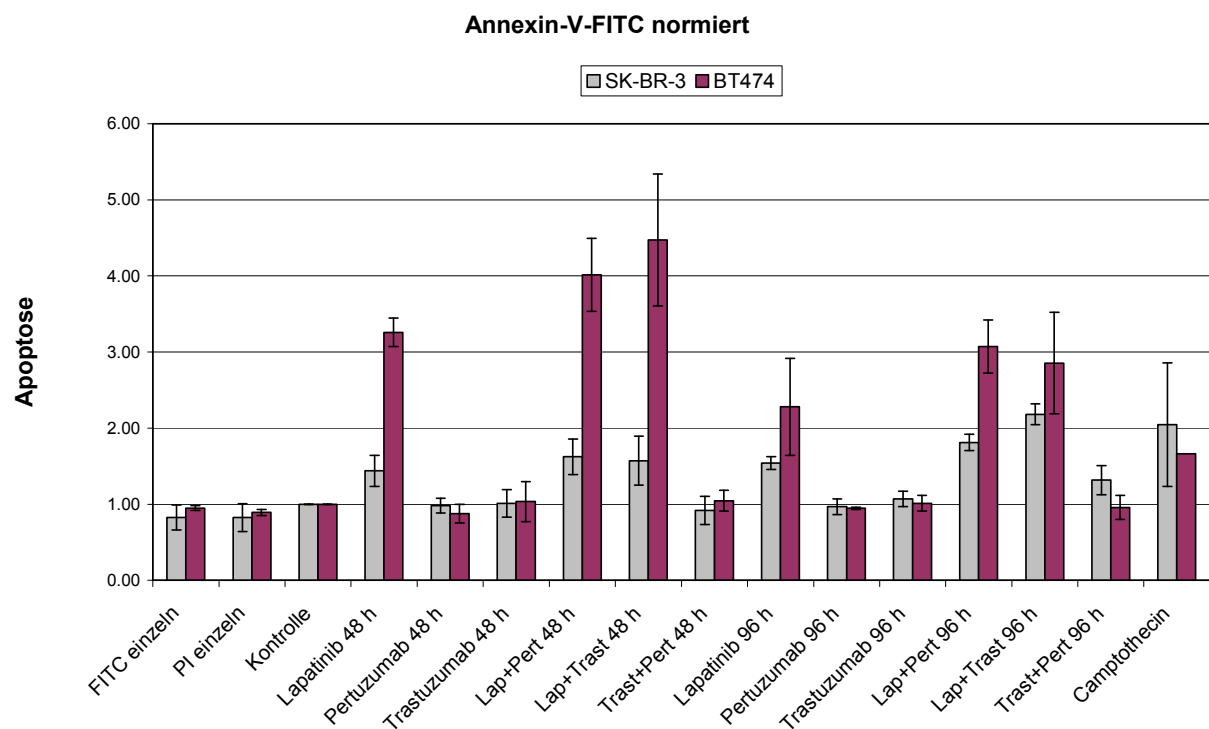
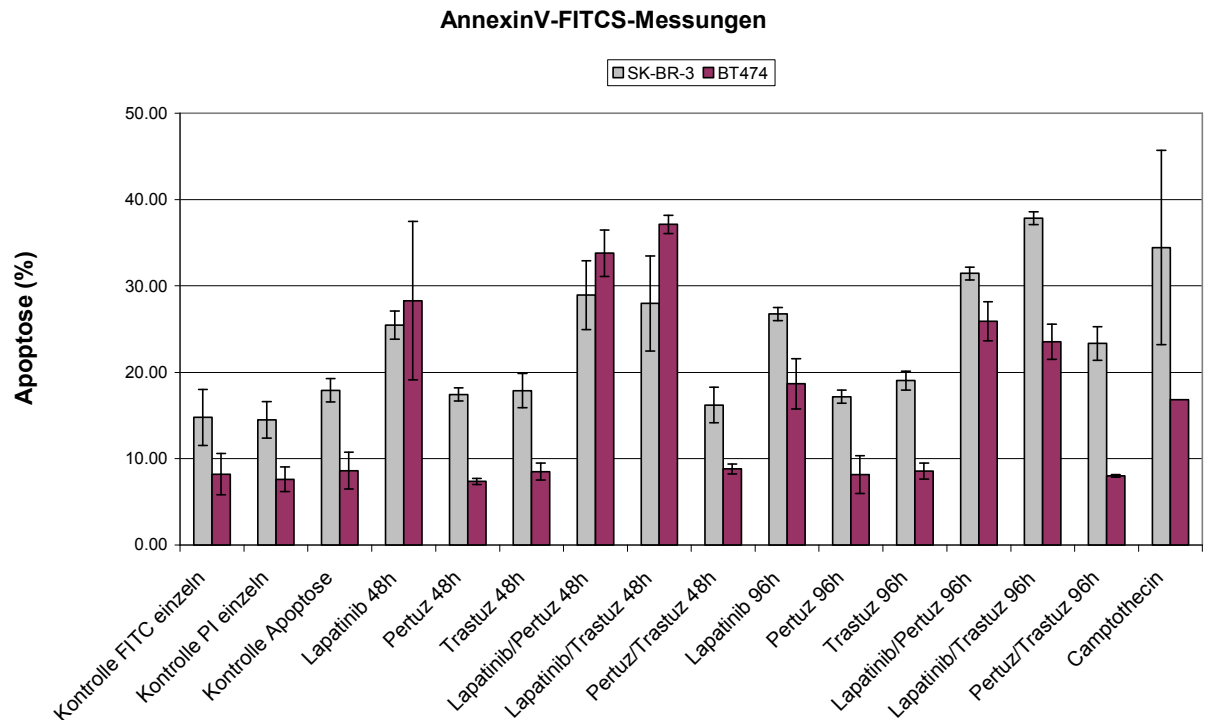


Diagramm 4: absolute und normierte Darstellung für die Annexin-V-FITC Messungen bei BT474 und SK-BR-3 Zellen

▪ Die Apoptosebestimmung bei BT474 Zellen durch Annexin-V-FITC Messungen

Bei BT474 Zellen liegt der Anteil unbehandelter Zellen bei 8,9%. Der durch 10 μ M Camptothecin induzierte Apoptosestimulus lässt den Anteil apoptotischer BT474 Zellen auf das 1,7-fache gegenüber der unstimulierten Kontrolle anwachsen. Betrachtet man das

Apoptoseverhalten während einer Exposition gegenüber singular eingesetzt Inhibitoren, so kann bei BT474 Zellen nach 48 h nur eine Monobehandlung mit Lapatinib einen merklichen Anstieg im Anteil der apoptotischen Zellen induzieren. Die Fraktion der apoptotischen Zellen erhöht sich um das 3,3-fache gegenüber ihrem Ausgangswert. Eine Monobehandlung mit Trastuzumab oder Pertuzumab hingegen ist nicht in der Lage, den kontrollierten Zelltod auszulösen. Die zugehörigen apoptotischen Zellfraktionen bewegen sich auf dem Niveau unbehandelter Zellen. Werden die beiden monoklonalen Antikörper dagegen mit Lapatinib kombiniert und den Zellen über 48 h verabreicht, so zeichnet sich ein erheblicher Anstieg in ihrem Apoptosegehalt ab, der sogar den einer 48-stündigen Lapatinib-Monobehandlung übersteigt. Wird Lapatinib mit Pertuzumab bzw. Trastuzumab kombiniert, steigen die sterbenden Zellen durchschnittlich auf 400% bzw. 450% der Kontrolle an. Eine Kombination der beiden Antikörper untereinander vermag dagegen keinen Apoptosestimulus zu induzieren. Wird der gleiche Behandlungsansatz über einen Inkubationszeitraum von 96 h wiederholt, so erhält man eine Darstellung der Apoptosewerte, die derjenigen der 48 h-Behandlung prinzipiell entspricht. Wieder kann weder durch Trastuzumab oder Pertuzumab alleine noch durch ihre Kombination der programmierte Zelltod eingeleitet werden. Lapatinib hingegen induziert auch hier Apoptose, was sich in der doppelten Menge an apoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle niederschlägt. Erneut kann die zusätzliche Gabe von Pertuzumab bzw. Trastuzumab zu Lapatinib eine weitere Steigerung der apoptotischen Zellfraktion und damit eine Erhöhung des unstimulierten Wertes auf das 3,1- bzw. 2,9-fache erzielen. Auffällig bei den 96 h-Werten ist eine Abnahme der apoptotischen Zellen in den mit Lapatinib behandelten Ansätzen gegenüber den jeweiligen 48 h-Werten. Bei den Behandlungen mit den monoklonalen Antikörpern ist zu keinem Inhibitionszeitpunkt eine klare Änderung des Apoptosegehaltes gegenüber dem Ausgangswert ersichtlich.

▪ Die Apoptosebestimmung bei SK-BR-3 Zellen durch Annexin-V-FITC Messungen

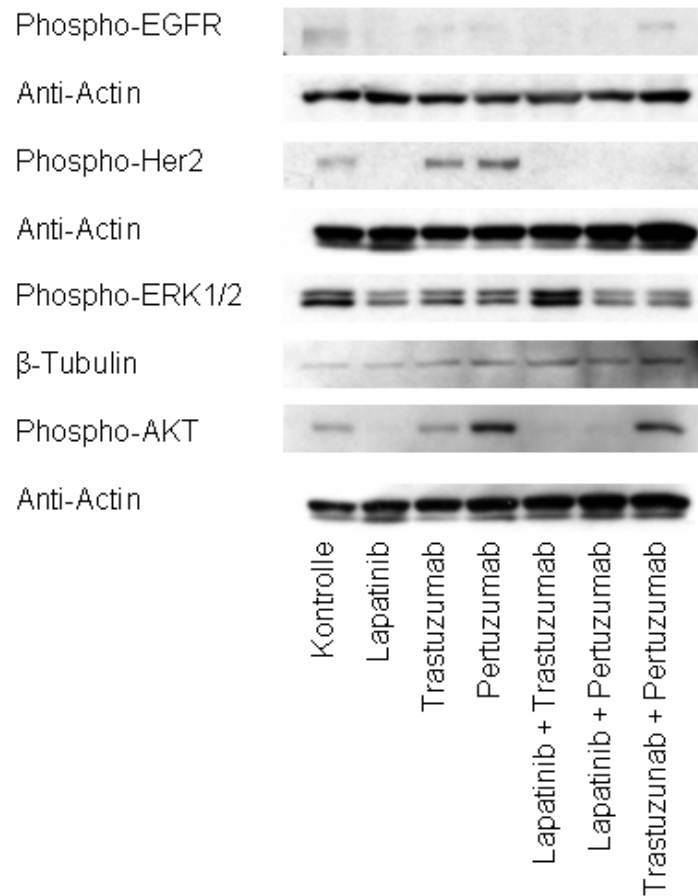
Bei unbehandelten SK-BR-3 Zellen ergibt sich mit 17,9% ein relativ hoher Kontrollwert. 10 μ M Camptothecin führen zu einer Verdopplung dieser apoptotischen Zellen. Wie bereits bei der Zelllinie BT474 zu beobachten war, kann auch bei SK-BR-3 Zellen weder durch Pertuzumab noch durch Trastuzumab oder aber die Kombination aus beiden Antikörpern ein pro-apoptotischer Stimulus erzeugt werden. Die jeweilige Quadrantenanalyse ergibt auch hier einen Apoptosegehalt, der dem Niveau unbehandelter Zellen gleichkommt. Einen Anstieg der apoptotischen Zellfraktion erhält man dagegen wiederum nur durch eine Behandlung der SK-BR-3 Zellen mit Lapatinib. Nach 48 h ergibt sich eine Erhöhung um 145% des Ausgangswertes. Ein Hinzufügen von Pertuzumab bzw. Trastuzumab zu Lapatinib bedeutet sogar eine Steigerung um das 1,6-fache gegenüber der Kontrolle. Die in den mit Lapatinib behandelten Kulturflaschen eingeleitete Apoptose fällt allerdings konstant geringer aus als bei der Zelllinie BT474. Bei den 96 h-Behandlungen können mehr Unterschiede aus dem normierten Diagramm herausgearbeitet werden, als es bei BT474 Zellen der Fall war. Während sich die mit Lapatinib behandelten Zellen in ihrem Apoptoseanteil nach 48 h und 96 h nur unwesentlich unterscheiden und Pertuzumab und Trastuzumab auch nach einer Verlängerung des Inkubationszeitraums weiterhin keine Apoptose induzieren, gibt die 96-stündige Behandlung mit Hinblick auf die Kombinationsversuche deutlichere Unterschiede zu erkennen. Wird Lapatinib zusammen mit

Pertuzumab bzw. Trastuzumab über 96 h SK-BR-3 Zellen verabreicht, so erhält man einen um 180% bzw. 220% erhöhten Wert gegenüber der Kontrollmessung und damit eine weitere Steigerung gegenüber der 48 h langen Inkubation. Bei BT474 konnte hingegen bei den 96-stündigen Behandlungsansätzen nur eine Abnahme der Apoptosefraktionen dokumentiert werden. Auch bei einer kombinierten Therapie mit Pertuzumab und Trastuzumab kann hier erstmals nach 96 h ein gegenüber der Kontrollprobe um das 1,3-fache erhöhter Anstieg im Apoptosegehalt verzeichnet werden. Dennoch bleibt diese Änderung nur geringfügig.

5.4 SDS-PAGE UND WESTERN BLOT UNTERSUCHUNGEN ZUR PHOSPHORYLIERUNG WICHTIGER REZEPTOR- UND SIGNALPROTEINE BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN

Um genauere Einblicke in die während Antikörper- und TKI-Behandlung veränderte Zellphysiologie gewinnen zu können, wurden *SDS-PAGE* und Western Blot Analysen für die beiden Zelllinien BT474 und SK-BR-3 nach der in Kap. 4.1.5 und 4.2 beschriebenen Zellbehandlung und Methodik durchgeführt. Während die Konzentrationen für Trastuzumab und Pertuzumab aus den vorangehenden Versuchen beibehalten wurden, wurden Behandlungen mit Lapatinib auf die höhere Konzentration von 100 nM beschränkt. Auf Rezeptorebene soll der Phosphorylierungsstatus von c-erbB1 und c-erbB2 nach einer 24-stündigen Inkubation mit Trastuzumab, Pertuzumab und Lapatinib alleine und in Kombination für beide Zelllinien untersucht werden. Der c-erbB2 stellt das spezifische *target* in der Therapie mit den monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab dar und wird auch zusammen mit c-erbB1 durch Lapatinib mit hoher Affinität gebunden. Seine Expression ist somit Voraussetzung für jede Anti-Tumor-Behandlung mit den genannten Substanzen und bei beiden Zelllinien in hoher Dichte nachgewiesen worden. Relevante Unterschiede im Koexpressionsmuster der ErbB-Rezeptoren ergeben sich jedoch in der Dichte der c-erbB1-Rezeptoren auf der Zelloberfläche, deren Gehalt in SK-BR-3 um das Dreifache gegenüber BT474 Zellen erhöht ist (67). Die folgenden Western Blot Untersuchungen sollen die tatsächliche Umsetzung der Zellbehandlung durch Inhibitoren des c-erbB2 und c-erbB1 bei gleichzeitig unterschiedlicher Rezeptorexpressionsdichte und Sensitivität der beiden Zelllinien verdeutlichen. Die weiter *downstream* gelegenen Proteine Phospho-ERK1/2 und Phospho-AKT repräsentieren als Aktivatoren der Zellproliferation und des -überlebens wichtige intrazelluläre Signalwege des c-erbB1 und c-erbB2 und können so Einblick in das Geschehen im Zellinneren unter Anti-Tumor-Behandlung verschaffen. Für die Western Blot Analytik wurden für jede Zelllinie zwei getrennte Lysate angefertigt und zur Kontrolle des Gesamtproteingehalts die Antigene Aktin bzw. β -Tubulin zusätzlich pro Membran detektiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Daten aus der densitometrischen Messung normiert und der Wert der Kontrolle mit eins gleich gesetzt. Die Standardabweichungen sind wieder durch die Fehlerindikatoren repräsentiert.

▪ Die Phosphorylierung von Rezeptor- und Signalproteinen bei BT474 Zellen



BT474-Western Blots

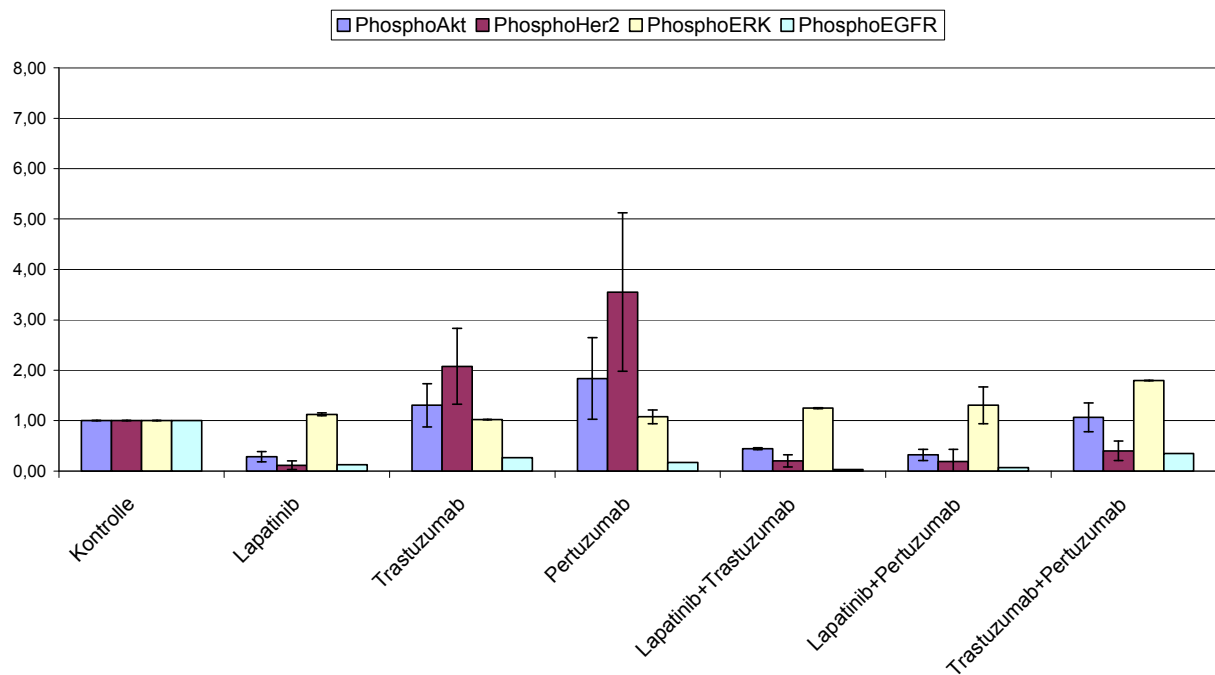
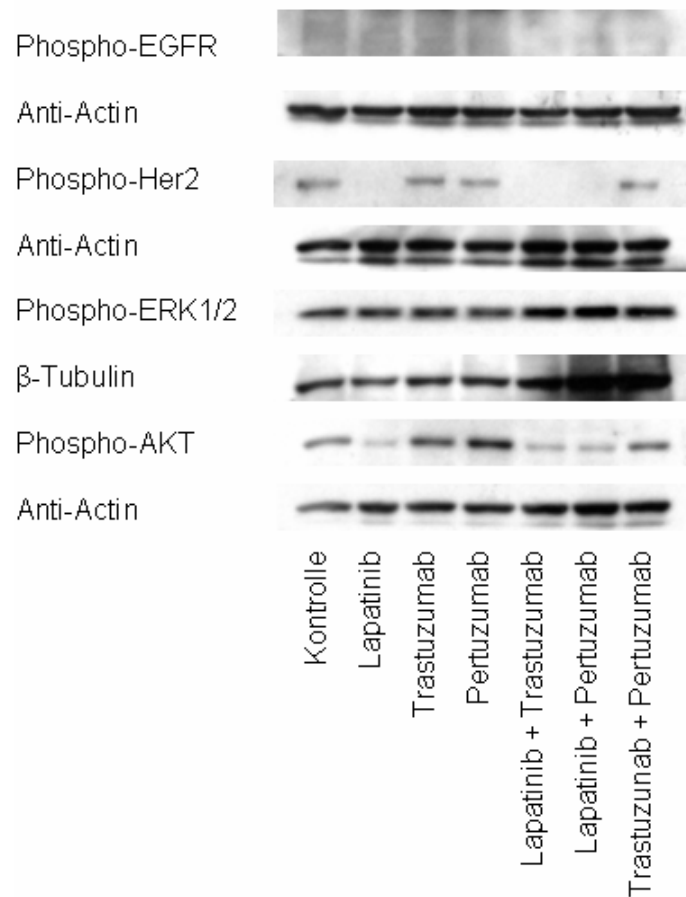


Diagramm 5: Western Blots für die Zelllinie BT474 mit densitometrischer Auswertung

BT474 Zellen exprimieren einen phosphorylierten und damit offensichtlich aktivierten c-erbB2 Rezeptor in unstimuliertem Zustand, der jedoch unter Behandlung mit Lapatinib eine starke Inhibition erfährt und durchschnittlich auf das 0,12-fache seines ursprünglichen Gehalts reduziert wird. Eine Einzelbehandlung mit Trastuzumab bzw. Pertuzumab entfaltet jedoch über einen Zeitraum von 24 h keinen inhibitorischen Stimulus und zeigt sogar eine Induktion der c-erbB2-Phosphorylierung auf Werte, die dem 2,1-, bei Pertuzumab sogar dem 3,6-fachen Gehalt gegenüber dem Ausgangswert entsprechen. Bei den Kombinationsbehandlungen können weitere Prozesse der *Downregulation* des phosphorylierten Rezeptors beobachtet werden. Mit Lapatinib und Trastuzumab bzw. Pertuzumab sinkt der Anteil des Phospho c-erbB2 auf 20%, mit einer Kombination aus Trastuzumab und Pertuzumab auf 40% gegenüber der unstimulierten Kontrolle ab. Der abgebildete Western Blot zur Detektion von Phospho-EGFR lässt auf eine geringfügige, aber erkennbare Expression des phosphorylierten EGFR in Ruhe bei der Zelllinie BT474 schließen. Jede therapeutische Behandlung – ob in Form einer Mono- oder Kombinationsbehandlung angewandt – führt jedoch zu einer deutlichen Verringerung seines Aktivitätsniveaus. Lediglich die Behandlungen mit Trastuzumab und Pertuzumab sowie der Kombination aus beiden lassen mit bloßem Auge eine schwache und im Vergleich zur Kontrolle deutlich verringerte Bande in Höhe des untersuchten Phospho-Proteins erkennen. Auch die densitometrische Auswertung ihrer Schwärzungsdichte korreliert mit einer starken *Downregulation* des phosphorylierten EGFR und rangiert im Bereich von 17% bis zu 35% des ursprünglichen Gehaltes. Jede Behandlung mit Lapatinib gibt rein optisch keine Bande auf der entsprechenden Western Blot Folie mehr zu erkennen und fällt auch in der Densitometrie auf Werte von bis zu 7% ab.

Der beispielhafte Western Blot zur Untersuchung des phosphorylierten Signalproteins AKT bei BT474 Zellen gleicht in seiner Kernaussage dem zur Zelllinie SK-BR-3. Wie auch schon bei der Detektion von Phospho-Her2 zu beobachten war, heben die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab auch das Aktivitätsniveau von AKT im Vergleich zur Kontrolle an. Im Schnitt liegen die Werte über dem 1,3- bzw. 1,8-fachen gegenüber der Norm. Wiederum erweist sich Pertuzumab als der stärkere Stimulator für die Phosphorylierung. Eine Kombination der beiden monoklonalen Antikörper erbringt jedoch ganz im Gegensatz zu Phospho-Her2 keine weitere Inhibition, sondern bewegt sich annähernd auf gleicher Höhe wie die Kontrollprobe. Eine Behandlung der Zellen mit Lapatinib hat abermals einen entscheidenden Einfluss auf die AKT-Phosphorylierung. Die Densitometrie zeigt einen Abfall des Phosphorylierungsstatus auf nur noch 28% für Lapatinib alleine und auf 44% bzw. 32% für die Kombinationen aus Lapatinib und Trastuzumab bzw. Lapatinib und Pertuzumab. Anders verhält es sich hingegen mit dem Signalprotein Phospho-ERK1/2. Sämtliche Einzel- und Kombinationsbehandlungen weisen keine auffällige Inhibition auf, sondern gruppieren sich mit Werten von 100% bis 130% vielmehr auf gleicher Höhe wie die Kontrolle. Lediglich eine doppelte Antikörperbehandlung lässt sogar einen Anstieg auf mehr als 180% der Norm erkennen. Auch aus dem abgebildeten Western Blot lassen sich keine deutlichen Unterschiede für die Regulation des Phospho-ERK1/2-Proteins herausarbeiten. Die stärkere Schwärzung für die Bande für die Lapatinib/Trastuzumab-Behandlung ist auf einen auch im Kontrollprotein β -Tubulin ersichtlichen erhöhten Gesamtproteingehalt zurückzuführen.

▪ Die Phosphorylierung der Rezeptor- und Signalproteine bei SK-BR-3 Zellen



SK-BR-3-Western Blots

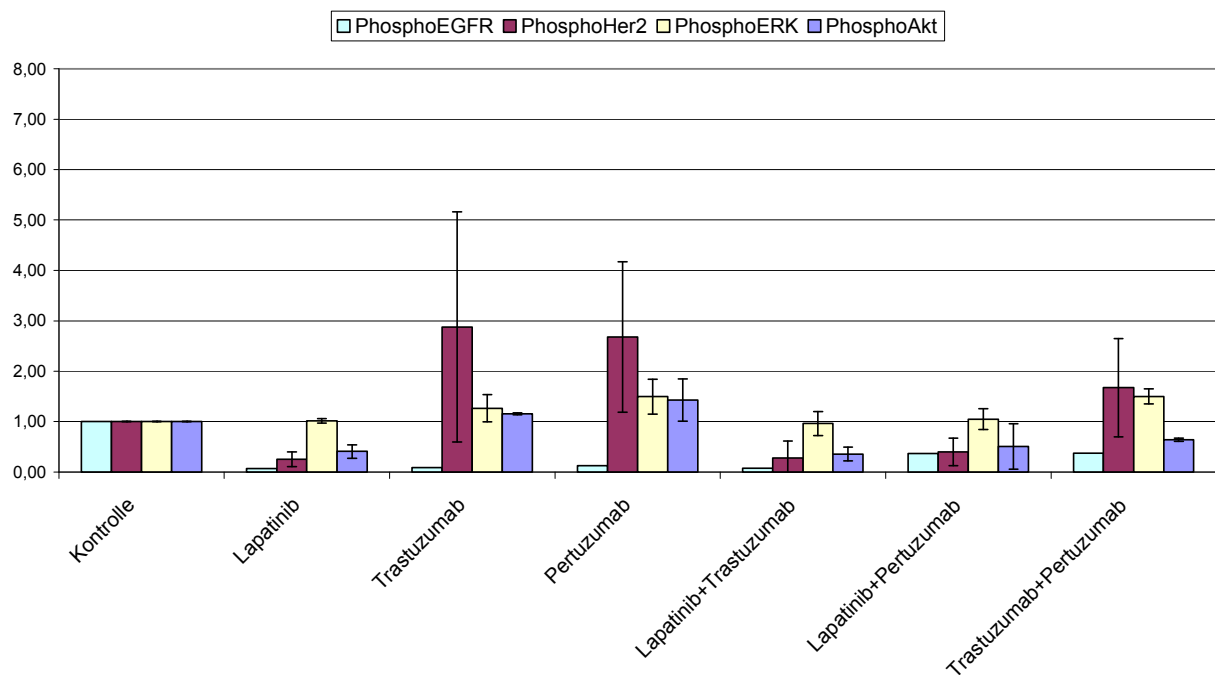


Diagramm 6: Western Blots für die Zelllinie SK-BR-3 mit densitometrischer Auswertung

Auch für die Zelllinie SK-BR-3 gilt, dass der phosphorylierte c-erbB2 in Abwesenheit von therapeutischen Substanzen exprimiert wird. Trotz der großen Standardabweichungen bestätigt sich die Beobachtung aus den Versuchen mit BT474 Zellen, dass die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab über einen Inkubationszeitraum von 24 h die c-erbB2-Phosphorylierung scheinbar induzieren. Durchschnittlich ist dabei ein Anstieg um das 2,9- bzw. 2,7-fache gegenüber der Kontrolle zu verzeichnen. Sogar die Kombination aus beiden verfügt über stimulatorisches Potential und liegt im Schnitt 1,6-fach über dem Kontrollwert. Wiederum kann durch eine Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Lapatinib alleine oder in Kombination mit Trastuzumab und Pertuzumab eine klare Abnahme des phosphorylierten c-erbB2 Rezeptors erreicht werden. Sein Aktivitätsniveau erreicht unter diesen Bedingungen nur mehr Werte in einer Größenordnung von 25% bis 40% im Vergleich zur normierten Kontrolle. Größere Unterschiede zur Zelllinie BT474 ergeben sich jedoch im Hinblick auf das Phosphorylierungsmuster des EGFR. Selbst im unstimulierten Zustand und bei langer Entwicklungszeit der Folie gibt die Abbildung für den Western Blot zur Detektion von Phospho-EGFR keine klar erkennbare Bande in Höhe des entsprechenden Phospho-Proteins mehr zu erkennen. Sein Aktivitätszustand in Ruhe liegt also merklich unter dem der BT474 Mammakarzinomzellen. Ebenso wie bei BT474 reduziert sich sein Phosphorylierungslevel auf noch geringere Werte durch jede Art therapeutischer Inhibition – seien es die monoklonalen Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab, der TKI Lapatinib oder die daraus erstellten Zweierkombinationen.

Auch das von SK-BR-3 Zellen in Ruhe phosphoryliert vorliegende Signalprotein AKT erfährt durch eine 24-stündige Antikörperbehandlung zunächst eine Zunahme in seinem Gehalt auf durchschnittlich 115% für Trastuzumab bzw. mit 140% noch mehr für Pertuzumab. Anders als bei BT474 reduziert sich der Anteil phosphorylierten AKT-Proteins durch eine Kombination aus beiden monoklonalen Antikörpern auf 64% seines Ausgangswertes. Auch hier vermag Lapatinib alleine mit einer Reduktion auf 41% oder in Kombination mit Trastuzumab und Pertuzumab mit jeweils nur noch 36% und 51% des ursprünglichen Phospho-Proteins das größte Ausmaß an Inhibition herbeizuführen. Wiederum fallen die Unterschiede bei der Untersuchung von Phospho-ERK1/2 äußerst gering aus. Während sich bei den therapeutischen Antikörpern eine Tendenz zur Stimulation abzeichnet – das Phosphorylierungslevel liegt durchschnittlich bei 126% für Trastuzumab und bei 150% für Pertuzumab und der Kombination aus beiden – bleibt der Gehalt an Phospho-ERK1/2 auch nach 24-stündiger alleiniger oder kombinierter Lapatinib-Behandlung annähernd auf dem Niveau der unstimulierten Kontrolle. Auch dies spiegelt sich im zugehörigen Western Blot unter Berücksichtigung der entsprechenden β -Tubulin Kontrolle wider.

5.5 CELL SIGNALING ANALYSEN MITTELS PHOSPHO-KINASE-ANTIKÖRPER-ARRAY BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN

Für den *Human Phospho-Kinase Array Kit* zur simultanen Detektion 46 spezifischer Kinase Phosphorylierungsstellen wurden die gleichen Lysate wie für die Western Blot Analysen verwendet. Allerdings musste auf eine weitaus größere Proteinmenge von 170 μ g pro Membran zurückgegriffen werden. Mit Hilfe einer so großen Anzahl von Phospho-Proteinen sollten nun in

viel detaillierterem Ausmaß vergleichende Aussagen über die Deaktivierung verschiedenster Signalproteine unter Behandlung bei BT474 und SK-BR-3 Zellen gemacht werden, wenn zuvor eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit Lapatinib, Trastuzumab, Pertuzumab und zusätzlich einer Kombination der Inhibitoren in Zweierpaaren stattgefunden hatte. Die Schwärzungsdichte der entsprechenden *Spots* der jeweiligen Behandlungen wurde nach dem in Kap. 4.2.3 beschriebenen Verfahren ausgewertet und als Ratio der einzelnen Behandlungen zum Kontrolllysat in Form eines Balkendiagramms abgebildet. Für die Identifizierung nennenswerter Aktivitätsunterschiede wurde ein *Threshold* von 25% gesetzt. Werte über 125% korrelieren mit einer *Upregulation*, unter 75% dagegen mit einer *Downregulation* des entsprechenden phosphorylierten Proteins.

■ *Cell Signaling* Analysen mittels Phospho-Kinase-Antikörper-Array zur Zelllinie BT474

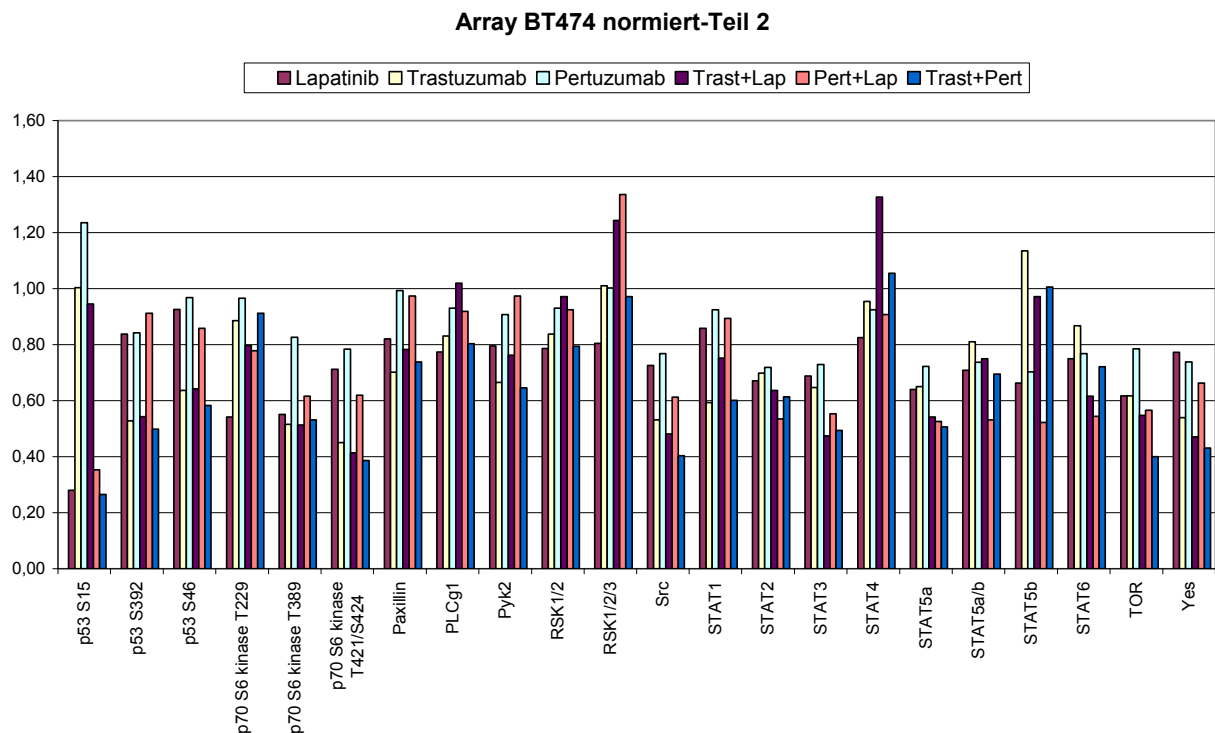
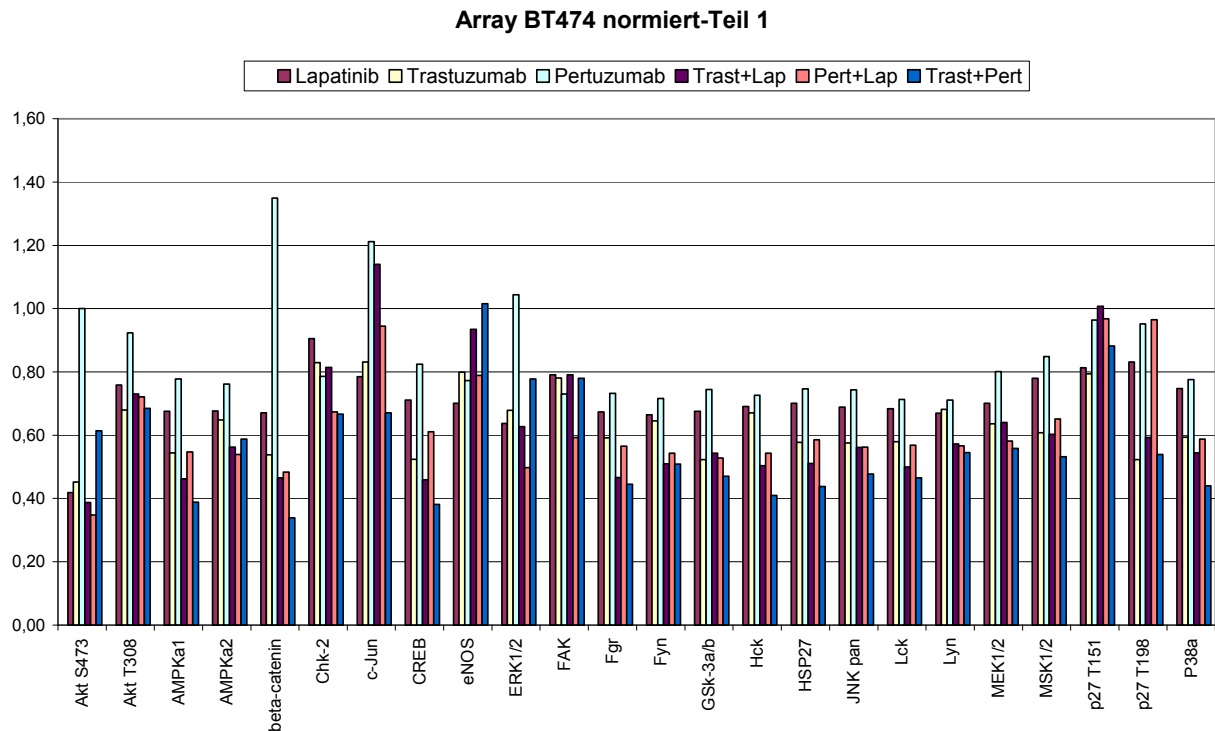


Diagramm 7: BT474 Array für alle Behandlungen

Das Gesamtbild des BT474 Phospho-Kinase-Arrays ist geprägt durch ein sich generell in vielen Proteinen und Behandlungen abzeichnendes *downreguliertes* Phosphorylierungsmuster. Besonders erwähnenswert ist dabei eine scheinbare Stufenbildung, bei der sich die

Einzelbehandlungen auf höherer Ebene wiederfinden als die Kombinationsbehandlungen. Nennenswerte Beispiele für dieses Phänomen wären die Proteine Fyn, Fgr, Hck, Lck, Lyn, P38a, TOR, JNK. Vergleicht man die Phosphorylierungsstelle S473 des *Arrays* für AKT mit dem zugehörigen Western Blot, so bestätigt sich die für die Lapatinib-Behandlungen nachgewiesene Abnahme der Proteinphosphorylierung auf bis zu 40% des Ausgangswertes und auch Pertuzumab grenzt sich durch höhere Phosphorylierungswerte wieder deutlich von den übrigen Behandlungen ab. Eine durch Trastuzumab oder Trastuzumab/Pertuzumab induzierte *Upregulation* der AKT-Phosphorylierung ist aus diesem *Array* jedoch nicht ersichtlich. Auch die zu AKT gehörige Phosphorylierungsstelle T308 weist für alle Behandlungen bis auf Pertuzumab eine erkennliche Inhibition auf. Die Angaben des *Arrays* über den Aktivitätszustand von ERK1/2 differieren zu denen des Western Blots. Hier findet sich eine Abnahme in der Proteinphosphorylierung für alle Behandlungen mit Ausnahme von Pertuzumab und Trastuzumab/Pertuzumab und erreicht ihren Tiefpunkt bei Lapatinib und Pertuzumab. Auch bei den Proteinen β -Catenin und c-Jun sticht die *Upregulation* durch Pertuzumab hervor. Bei der Betrachtung einiger Phosphorylierungsstellen von Tumorsuppressorgenen fällt eine merkliche Inhibition auf. Dies gilt für die Untereinheiten T198 von p27 sowie S392 und S46 von p53 unter Exposition von Trastuzumab alleine oder seiner Kombination mit Lapatinib bzw. Pertuzumab. Die Phosphorylierungsstelle S15 von p53 unterliegt der stärksten *Downregulation* im gesamten *Array* in Anwesenheit von Lapatinib alleine oder zusammen mit Pertuzumab sowie beiden kombinierten monoklonalen Antikörpern. Auch die JAK-/STAT-Signalproteine erfahren eine massive Dephosphorylierung durch die genannten Inhibitoren. Den niedrigsten Phosphorylierungsgrad unter antiproliferativer Therapie weisen dabei die Proteine STAT2, STAT3 und STAT5a auf.

■ *Cell Signaling* Analysen mittels Phospho-Kinase-Antikörper-Array zur Zelllinie SK-BR-3

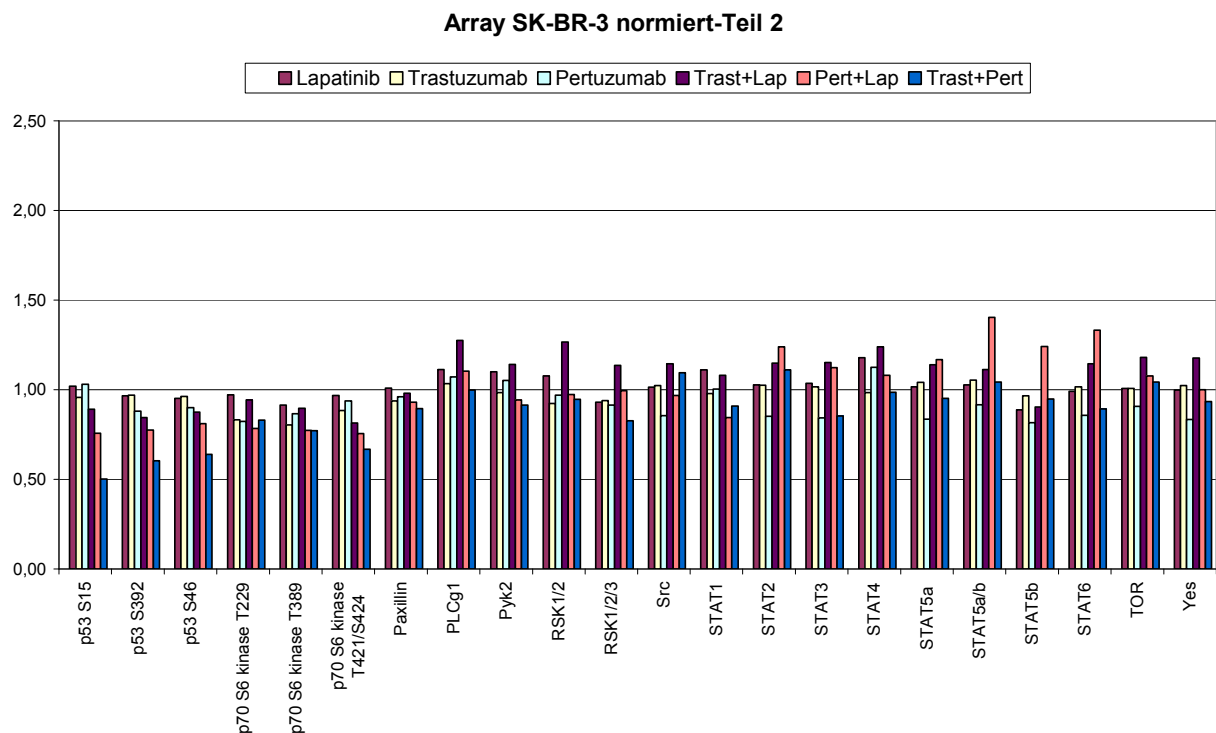
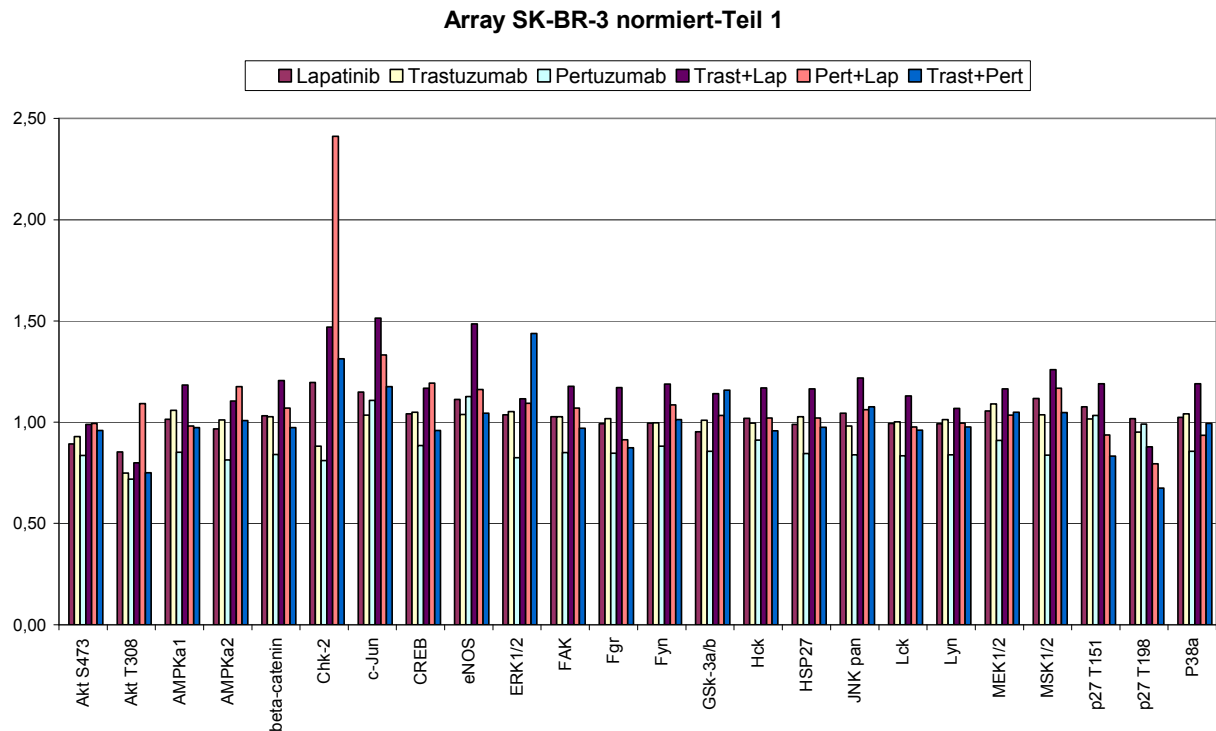


Diagramm 8: SK-BR-3 Array für alle Behandlungen

Bei der Betrachtung der einzelnen Phospho-Proteine gibt es für die Zelllinie SK-BR-3 über wenig Auffälligkeiten zu berichten. Über große Strecken imponiert der SK-BR-3 Phospho-

Kinase-Array als ein sich für alle Behandlungen homogen knapp über und unter dem neutralen Phosphorylierungslevel befindliches Bild. Selbst die im Western Blot ersichtliche Dephosphorylierung des AKT-Proteins an der Serinstelle 473 unter Lapatinib-haltiger Behandlung lässt sich in dieser Darstellung nicht wieder finden. Dennoch zeugt auch der SK-BR-3-Array von einer *Downregulation* der AKT-Phosphorylierung, die sich allerdings auf die Phosphorylierungsstelle T308 bezieht. Bis auf die Kombination von Lapatinib mit Pertuzumab fallen alle Behandlungsansätze auf ein 0,7- bis 0,85-faches des ursprünglichen Aktivitätsgrades herab. Ebenso wie der Western Blot zeigt auch die Array-Analyse für das phosphorylierte Signalprotein ERK1/2 keine bedeutsame Regulation unter Behandlung. Wiederum findet sich hier eine Stimulation durch die beiden monoklonalen Antikörper im kombinierten Einsatz auf bis zu 144%. Der geringere Wert bei der Pertuzumab-Behandlung von 83% ist im Kontext der insgesamt verringerten Pertuzumab-Werte innerhalb der Schwankungsbreite für die Norm als wenig bedeutend einzustufen. Augenfällig ist ebenfalls die unter Kombinationsbehandlung der monoklonalen Antikörper untereinander oder mit Lapatinib *upregulierte* Phosphorylierung der Chk-2. Ebenso findet sich für die Phosphorylierungsstellen T157 und T198 des Tumorsuppressorgens p27 sowie S15, S392 und S46 von p53 eine treppchenförmige Abnahme der Proteinphosphorylierung. Eine merkliche Inhibition zeichnet sich allerdings erst bei einer Kombinationsbehandlung ab, die dann wiederum am stärksten für die Therapien Lapatinib und Pertuzumab sowie Trastuzumab und Pertuzumab ausfällt. Für die übrigen Proteine des *Kits* muss eher von einem neutralen Phosphorylierungslevel ausgegangen werden.

6 DISKUSSION

6.1 DER EINFLUSS VON WACHSTUMSFAKTOREN AUF DIE TUMORTHERAPIE MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

Die dynamische Proliferationsanalyse zur Zellzykluskinetik von BT474 und SK-BR-3 Zellen erlaubt interessante Einblicke in die Regulation der Zellproliferation unter Behandlung mit tumortherapeutisch wirksamen Antikörpern, TKI sowie Wachstumsfaktoren und zeugt von zellspezifischen Proliferationsinhibitoren und -stimulatoren. Im Zentrum der Untersuchungen steht dabei die Anwendung des erst seit wenigen Jahren für die Mammakarzinomtherapie zugelassenen TKIs Lapatinib. Seine duale Angriffsweise am EGFR und Her2 prädestiniert ihn gerade in Verbindung mit weiteren alternativen Methoden des ErbB-Rezeptor-*targetings*, wie z.B. den monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab, für eine modular gestaltete Therapie zur Steigerung des antiproliferativen Effekts. Dies ist besonders im klinischen Alltag wichtig, in dem Therapieversagen und Resistenzentwicklung gegenüber Trastuzumab keine Seltenheit darstellen (vgl. Kap. 1.3.1). Eine wichtige Ursache hierfür liegt in der bereits in Studien belegten gleichzeitigen Anwesenheit von verschiedensten ErbB-Rezeptor-Liganden im Tumorgewebe (77), die zur autokrinen und parakrinen Stimulation führen können. Viele Studien belegen derzeit die synergistische Wirkung von Lapatinib mit Trastuzumab (46;48;50;76) und sollen in den folgenden Kapiteln auch unter Erweiterung der Diskussion auf den Antikörper Pertuzumab eingehender beleuchtet werden. Die gewonnenen Daten sollen unter dem vorrangigen Aspekt untersucht werden, ob Wachstumsfaktoren grundsätzlich in der Lage sind, den Effekt verschiedenster Anti-Her2-Therapien zu kompensieren und ob andererseits eine Erweiterung der Therapie auf mehrere Substanzen diese Gegenstimulation wieder aufheben kann.

▪ Die BrdU/Hoechst-*Quenching* Versuche der Zelllinie BT474

Wie auch in früheren Publikationen demonstriert werden konnte, verursacht Trastuzumab einen signifikant erhöhten G₀-Exit der BT474-Zellen, der seinerseits von der An- und Abwesenheit der Wachstumsfaktoren EGF und HRG beeinflusst werden kann. EGF wird aufgrund vermehrter EGFR/EGFR-Homo- und EGFR/c-erbB2- oder auch c-erbB4-Heterodimerisierung ein proliferativer Stimulus zugeschrieben und vermag so die von Trastuzumab eingeleitete Zellinhibition partiell zu kompensieren (64;68;78). Die deutlich geringere, aber trotzdem signifikante Zellinhibition durch Pertuzumab stellt ein bekanntes Phänomen in der unterschiedlichen Effizienz beider Antikörper in BT474 Zellen dar (43;64). Mit dem weitaus größten Anteil arretierter Zellen sticht Lapatinib als stärkster Zellzyklusinhibitor unter allen therapeutischen Substanzen hervor. Diese Beobachtung korreliert ebenso mit zahlreichen Angaben in der Literatur, die für Lapatinib eine *in-vivo* und *in-vitro* ermittelte Inhibition des Tumorwachstums c-erbB2 überexprimierender Zelllinien bei nur nanomolarer Lapatinib-Konzentration beschreiben und eine duale Inhibition der beiden onkogen aktiven Rezeptoren

EGFR und Her2 in einem dysregulierten Signaltransduktionsnetzwerk als effektiver erachten als nur den Angriff eines singulären Rezeptors (47;76). Mit einem gleichzeitig hohen Gehalt an überexprimiertem ErbB2-Protein und niedrigeren EGFR-Konzentrationen fallen BT474 zudem in das optimale Wirkspektrum des dualen Tyrosinkinaseinhibitors (76). Wie zuvor bei Trastuzumab beobachtet, schafft auch hier die Zugabe von EGF eine partielle Kompensation des Zellzyklusblocks mit einer Art Gleichgewicht zwischen Inhibition und Kompensation. Wiederum scheint eine EGFR-Homo- und Heterointeraktion (68) die vom Wachstumsfaktor EGF erzielte Gegenstimulation zu bedingen. Wird nun aber die antiproliferative Behandlung auf zwei Anti-Tumor-Substanzen ausgedehnt, so kann der Kompensationsmechanismus von EGF durchbrochen und ein ähnlich hoher G_0 -Exit wie bei alleiniger Lapatinib-Behandlung erzielt werden. In unterschiedlichen Studien hat sich bereits der Synergismus von Lapatinib und Trastuzumab bestätigt. Obwohl die Ursachen hierfür nur wenig erforscht sind, soll Trastuzumab laut einer Theorie von Konecny et al. eine Sensitivierung der Zellen gegenüber Lapatinib hervorrufen (76). Zudem berichten Scaltriti et al. nach Lapatinib-Behandlung von einer Stabilisierung und Akkumulation inaktiver Her2-Dimere auf der Zellmatrix, die wiederum ursächlich für eine prolongierte Trastuzumab-Aktivität sein könnte. Das dort präsentierte Bild einer „Ligandenfalle“, bei der inaktive Dimere zwar in der Lage sind, Liganden zu binden, aber keine weitere Phosphorylierung einleiten, passt zu den hohen G_0 -Werten unter Lapatinib/Trastuzumab-Exposition trotz Stimulation mit EGF (50). Die vorliegenden G_0 -Daten zeigen, dass nicht nur der monoklonale Antikörper Trastuzumab, sondern auch Pertuzumab zu dieser Reversierung von EGF-*getriggerten* Kompensationssignalen im Stande ist und somit die zytostatische Wirkung Lapatinibs potenzieren kann – ganz im Unterschied zu seiner alleinigen Anwendung, bei der noch kein großer inhibitorischer Effekt erkennbar war. Die in der Literatur vielfach angesprochene dosisabhängige Wirkung Lapatinibs (50;76) kommt auch in den vorliegenden Proliferationsdaten nach der *Quenching* Methode zum Ausdruck. Mit einer Konzentration von 10 nM Lapatinib wird die IC_{50} von BT474 Zellen in Höhe von 22 nM (76) unterschritten und es werden nur noch etwa halb so viele Zellen in Ruhe getrieben wie zuvor bei 100 nM Lapatinib. Auch wenn sich damit insgesamt erniedrigte G_0 -Werte ergeben, so lassen sich die aus der höheren Konzentrationsreihe gewonnenen Erkenntnisse reproduzieren. Aufgrund der verminderten Lapatinib-Konzentration liegt hier sogar eine vollständige Kompensation der Wachstumsinhibition mit Hilfe von EGF vor, die sich im Gegenzug durch ein modular gestaltetes Kombinationsschema abermals reversieren lässt. Am meisten imponiert jedoch die von Heregulin in allen Behandlungen mit mAbs, Lapatinib oder deren Kombinationen erzielte vollständige Kompensation der Zellinhibition. Auch schon in Voruntersuchungen konnte Heregulin den effektivsten Proliferationsreiz liefern (68;78). Als Ursache für dieses Phänomen wird eine Induktion stark potenter Her2/Her3-bzw. Her2/Her4-Heterointeraktionen vermutet (6), die offensichtlich unabhängig von Konzentrationen und Kombinationen eine von allen Substanzen verursachte Quieszenz der Zellen überwinden kann. Also muss davon ausgegangen werden, dass selbst eine duale Inhibition am EGFR und Her2 sowie eine Antikörpertherapie gegen den überexprimierten c-erbB2 selbst nicht gegenüber einer Rekrutierung von Her2/Her3- und Her2/Her4-Heterodimeren durch HRG greifen kann. Lediglich bei der Kombination 100 nM Lapatinib/Pertuzumab stellt sich auch bei Zugabe von HRG nur eine partielle Kompensation ein. Diese Tatsache, zusammen mit der Beobachtung, dass BT474

Zellen mit einer Behandlung aus 10 nM Lapatinib/Pertuzumab/EGF effektiver in Ruhe getrieben werden können als mit 10 nM Lapatinib/Trastuzumab/EGF oder 10 nM Lapatinib alleine, lassen auf eine stark inhibitorische Potenz dieser Kombination schließen. Tatsächlich deuten die vorliegenden Untersuchungen stark darauf hin, dass der inhibitorische Mechanismus Pertuzumabs vorrangig auf der Verhinderung der c-erbB2-Heterodimerisierung mit dem EGFR (79), weniger oder gar nicht aber mit c-erbB3 oder c-erbB4 beruht. Trastuzumab hingegen wird für eine vermehrte Bildung und Degradation von aus c-erbB2 bestehenden Homodimeren verantwortlich gemacht (23;43). Damit erklärt sich die ausbleibende Kompensation von EGF unter Pertuzumab-Behandlung und das fehlende Reversierungspotential aller Behandlungen gegenüber HRG. Lediglich beim Hinzufügen von Pertuzumab zu 100 nM Lapatinib/HRG kann ein Wiederanstieg der G₀-Fraktion verzeichnet und damit bei maximaler Lapatinibkonzentration ein Heterodimerisierungsblock auch in Richtung c-erbB3 und c-erbB4 erahnt werden. Dieser Effekt fällt allerdings sehr viel geringer aus als bei der Reversierung von EGF-*getriggerten* Proliferationssignalen und ist auch nur einmal bei der Zelllinie BT474 zu beobachten. Diese gilt ohnehin als sensitiver (64;68) und bestätigt diese These auch hier durch insgesamt höhere G₀-Fraktionen unter Behandlung als die Zelllinie SK-BR-3.

▪ Die BrdU/Hoechst-*Quenching* Versuche der Zelllinie SK-BR-3

Die Unterschiede im Ansprechen beider Zelllinien auf die verschiedenen Methoden des ErbB2-Rezeptor-*targetings* können vor dem Hintergrund ihres unterschiedlichen EGFR-/c-erbB2-Koexpressionsmusters interpretiert werden. SK-BR-3 Zellen unterscheiden sich von BT474 Zellen durch ihren dreimal höheren EGFR-Gehalt (67). Das verminderte, aber dennoch signifikante Ansprechen von SK-BR-3 Zellen auf eine Trastuzumab-Behandlung suggeriert, dass ein neben dem c-erbB2 koexprimierter EGFR maßgeblich an der lateralen Signalgebung und damit an der Vermittlung des antiproliferativen Effekts von Trastuzumab beteiligt ist (68). Die geringere Responstrate der SK-BR-3 Zellen auf eine Antikörpertherapie betrifft dabei nicht nur Trastuzumab, sondern auch Pertuzumab und ist in der Literatur ebenso vielfach beschrieben worden (43;64;68). Die Erwartungen eines größeren Therapieerfolges durch eine doppelte Inhibition am EGF- und Her2-Rezeptor gerade für EGFR-koexprimierende Zelllinien (68) erfüllen sich mit Lapatinib für SK-BR-3 Zellen. Eine duale Tyrosinkinaseinhibition erzielt, wie zuvor bei der Zelllinie BT474, das größte Ausmaß an Wachstumsinhibition, wenn auch mit insgesamt geringeren Absolutwerten. Hier kann ebenso der Unterschied im Ansprechen der beiden Zelllinien durch den höheren EGFR-Gehalt in SK-BR-3 Zellen erklärt werden, der laut der Aktivitätsbestimmung von Konecny et al. mit höheren IC₅₀-Raten assoziiert ist und im Fall von SK-BR-3 37 nM beträgt (76). Ebenso resultiert die Zugabe von EGF zu 100 nM Lapatinib in einer partiellen Kompensation des Proliferationsblocks, der im Gegensatz zu BT474 nur durch eine weitere Behandlung mit dem mAb Pertuzumab, nicht aber mit Trastuzumab reversiert werden kann. Aufgrund des erhöhten EGFR-Koexpressionslevels kann eine durch Trastuzumab gesteigerte c-erbB2-Homoassoziation in Anwesenheit von 100 nM Lapatinib und EGF das Gleichgewicht beider Stimuli nicht zurück in Richtung Inhibition verlagern. Dies gelingt hingegen nur durch eine zusätzliche Unterbindung der EGFR-/c-erbB2-Heterodimerisierung mit Rückgriff auf die Substanz Pertuzumab. Dieser Kombinationsansatz zeugt erneut von einer verringerten Trastuzumab-Sensitivität der SK-BR-3 Zellen (68) und bestätigt zugleich die bei den BT474-

Daten aufgestellte Vermutung, dass Pertuzumab die Wirkung Lapatinibs erheblich potenzieren und so einen äußerst potenten antiproliferativen Effekt entfalten kann. Diese Beobachtung wiederholt sich gleichermaßen bei der analog aufgebauten Kombinationsreihe zu nur 10 nM Lapatinib und unterstreicht die Überlegenheit Pertuzumabs gegenüber Trastuzumab bei gleichzeitiger Behandlung mit 10 nM Lapatinib und EGF. Zudem manifestiert sich auch in diesen dynamischen Proliferationsmessungen die Dosisabhängigkeit Lapatinibs und zeigt bei SK-BR-3 Zellen für 10 nM Lapatinib nur 1/5 der G₀-Fraktion bei 100 nM, die somit insgesamt nur sehr wenig zum Tragen kommt. An vielen Stellen bestätigen sich für SK-BR-3 Zellen die für BT474 Zellen geltenden Beobachtungen einer partiellen bzw. vollständigen Kompensation der Wachstumsinhibition durch EGF bzw. HRG. Dennoch müssen bei einer Wachstumsfaktorstimulation der Zelllinie SK-BR-3 zwei weitere Aspekte besondere Berücksichtigung erfahren. Der massive Anstieg der G₀-Zellen unter Zugabe von EGF zu 10 nM Lapatinib bringt die inhibitorische Seite von EGF für Behandlungen von SK-BR-3 Zellen zum Vorschein, die ein weiteres Mal ihrem erhöhten EGFR-Gehalt zugeschrieben werden kann. Dieselbe Tendenz ist auch aus den Kombinationen des Wachstumsfaktors mit den monoklonalen Antikörpern ersichtlich – wenn auch in weitaus geringerer Ausprägung – nicht aber, wenn zuvor bereits eine ausgeprägte Proliferationsinhibition vorliegt, wie im Fall der Administration von 100 nM Lapatinib. Dieser anti-mitogene Effekt einer EGF-Behandlung korreliert dabei mit einer noch weiter verminderten EGFR-/Her2-Heterodimerisierung und wird stattdessen einer leicht gesteigerten EGFR-/EGFR-Homoaggregation zugeschrieben (67;68). Doch nicht nur die Anwesenheit von EGF, sondern auch die von Heregulin kann in einer verminderten Proliferationsrate der SK-BR-3 Zellen resultieren. Auch bekannt als *Neu differentiation factors* induzieren sie die terminale Differenzierung von Geweben, was schon begrifflich einer gesteigerten Proliferation entgegensteht (17). Auf diese Weise erklärt sich der aus der Kombination von Trastuzumab mit Heregulin beobachtete inhibitorische Effekt. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den Erkenntnissen von Daly et al., die insbesondere für SK-BR-3 und weitere Her2 überexprimierende Mammakarzinomzelllinien unter Heregulin-Exposition eine Inhibition des Zellwachstums bis hin zur Apoptose gefunden haben (80).

Aus diesen dynamischen Proliferationsuntersuchungen mittels der durchflußzytometrischen „*Quenching* Methode“ lässt sich herauslesen, dass ein effektives Rezeptor-*targeting* nicht auf der alleinigen Grundlage einer Her2/neu Überexpression gestaltet werden kann, sondern entscheidend vom Koexpressionsprofil weiterer ErbB-Rezeptoren sowie der Anwesenheit ihrer spezifischen Liganden abhängig ist. Unterschiede in der Koexpressionsdichte des EGFR sowie die von potenten Wachstumsfaktoren erzeugten Veränderungen im Rezeptor-Dimerisierungsmuster können entscheidend die antiproliferative Kapazität von Anti-Tumor-Substanzen unterminieren. Als ebenso bedeutsam bei der Gestaltung einer multimodalen Therapie haben sich die unterschiedlichen Angriffsweisen monoklonaler Antikörper bei der Blockade von Rezeptor-Rezeptor-Interaktionen herausgestellt und weisen besonders den mAb Pertuzumab als attraktiven Kombinationspartner einer Lapatinib-Therapie aus (58).

6.2 DIE REVERSIBILITÄT DER DURCH LAPATINIB INDUZIERTEN ZELLINHIBITION

Für die vergleichende Betrachtung der durch tumortherapeutisch wirksame Substanzen und Wachstumsfaktoren eingeleiteten Zellinhibition oder -stimulation dienten die nach 96-stündigen Behandlungen ermittelten G_0 -Messungen. Eine Ausdehnung der Untersuchungen zu beiden Lapatinib-Konzentrationen auf zwei unterschiedlich lange Zeitpunkte mit anschließender Regenerationsphase unter Berücksichtigung der S-Phase-Fractionen sollte nun weitere Einblicke in die unterschiedliche Sensitivität beider Zelllinien gestatten. Zusätzlich ermöglicht dieser Untersuchungsansatz eine Optimierung der Behandlung durch die Identifizierung von individuell geeigneten Lapatinib-Konzentrationen und Behandlungszeiträumen.

▪ Die Reversibilität der Administration von 100 nM und 10 nM Lapatinib der Zelllinie BT474

Die G_0 -Fraktion der Zelllinie BT474 aus der Reversibilitätsuntersuchung zur 96-stündigen Behandlung mit 100 nM Lapatinib deckt sich mit den Ergebnissen aus Kap. 5.1. Selbst die hier speziell angeschlossene Regenerationsphase kann den massiv erhöhten Anteil an nicht-proliferierenden Zellen nicht verringern. Diese Tatsache spiegelt sich auch in der zugehörigen S-Phase-Fraction wider, die sich im Vergleich zur Kontrolle auf nur mehr ein Drittel reduziert. Eine über 96 h anhaltende Behandlung mit 100 nM Lapatinib mündet für BT474 Zellen also in einen definitiven Zellzyklusarrest, der so jegliche Proliferationsaktivität sichtlich unterbindet und die Zellen effizient in Ruhe treibt. Bei der Betrachtung der G_0 -Phase-Fraction finden sich nur minimale Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeitpunkten. Aus der Analyse der S-Phasen lässt sich jedoch erkennen, dass sich bei nur 48-stündiger Behandlung mit 12% nur geringfügig weniger Zellen an der DNA-Replikation beteiligen als im unbehandelten Zustand mit 14%. Diese beginnende Regeneration im Vergleich zur 96-stündigen Lapatinib-Inkubation kann aber dennoch nur einen geringfügigen Einfluss auf die zugehörige G_0 -Fraktion nehmen und so die vorherrschende Proliferationsinhibition trotz des angeschlossenen Erholungszeitraums nicht überwinden.

Auch eine 96-stündige Inkubation mit nur 10 nM Lapatinib entfaltet bei der Zelllinie BT474 mit einem Anstieg der G_0 -Zellen von 5,4% auf 26,6% einen deutlich inhibitorischen Effekt. Im Gegensatz zur höher konzentrierten Versuchsreihe bleibt eine Affektion der S-Phase-Zellen dabei allerdings aus, die sich zum Zeitpunkt der Ernte wieder auf dem Niveau von unbehandelten Zellen befinden. Im Gegensatz zur Administration von 100 nM Lapatinib nehmen BT474 Zellen hier also offenbar ihre Proliferationsaktivität wieder auf. Durch eine partielle Regeneration in der angeschlossenen Wachstumsphase könnten auch die Unterschiede zur BrdU-Hoechst-*Quenching* Messung aus Kap. 5.1 zustande kommen, die doppelt so viele quieszente Zellen verzeichnet, aber allerdings auch schon nach abgeschlossener Lapatinib-Inkubation endet. Wird die Behandlung mit 10 nM Lapatinib auf nur 48 h verkürzt, bleibt auch für BT474 Zellen eine nennenswerte Inhibition aus. Auch in den zugehörigen S-Phase-Daten manifestiert sich eine über das Niveau der Kontrolle hinaus reichende Proliferationsaktivität der Zellen und dient so als Erklärungsgrundlage für die stattgefundene Erholung.

- Die Reversibilität der Administration von 100 nM und 10 nM Lapatinib der Zelllinie SK-BR-3

Wird die Zelllinie SK-BR-3 über 96 h mit 100 nM Lapatinib inkubiert, so verdeutlicht die massiv erhöhte G_0 -Phase-Fraktion zusammen mit einer gleichzeitigen Verminderung der S-Phase-Fraktion die unter Behandlung erlittene Wachstumsinhibition. Wenn auch die Prozentwerte für beide Analysen unter denen der Zelllinie BT474 liegen, ergeben sich auch für SK-BR-3 Zellen keine Hinweise auf eine Erholung von der zytostatischen Behandlung. Im Vergleich zu den Proliferationsergebnissen nach der „*Quenching Methode*“ fällt der Anteil der G_0 -Zellen für den Reversibilitätsversuch zwar deutlich höher aus, zugleich ist hier allerdings auch die G_0 -Fraktion der zugehörigen Kontrolle in gleichem Maße erhöht und könnte so für die bestehenden Unterschiede verantwortlich sein. Die Datenlage verändert sich jedoch bei einer Verkürzung des Inkubationszeitraums für 100 nM Lapatinib auf nur 48 h. Mit 25% S-Phase-Zellen gegenüber normwertigen 9% stellt sich bei SK-BR-3 Zellen ein deutlicher Regenerationsprozess ein. Ganz im Gegensatz zur Zelllinie BT474 schlägt sich eine derart „überschießende“ Teilungsaktivität somit auch in einer vergleichsweise geringeren G_0 -Fraktion nieder und belegt die stattgefundene partielle Erholung.

Der G_0 -Wert für die 96-stündige Behandlung der SK-BR-3 Zellen mit 10 nM Lapatinib stimmt mit den Daten aus Kap. 5.1 überein und dokumentiert nur eine geringe Inhibition, die erneut niedriger ausfällt als bei der Zelllinie BT474. Passend zu diesem geringen Effekt liegt hier nach der Behandlungs- und Regenerationsphase eine unversehrte S-Phase-Fraktion vor. Wie auch schon bei der höheren Konzentration beobachtet, erlaubt eine Verkürzung des Behandlungszeitraums eine übermäßige Fraktion an in der S-Phase befindlichen Zellen, die so in einer vollständigen Erholung der G_0 -Fraktionen resultiert.

Eine Behandlung der Zellen mit einer ausreichenden Lapatinib-Konzentration führt eindeutig zu einem Proliferationsblock, der am Arrest in der G_0 -Phase und einer verminderten S-Phase-Fraktion abzulesen ist (48). Zusätzlich bringen die hier gewonnenen Daten nicht nur den dosisabhängigen Aspekt Lapatinibs, sondern auch seine zeitabhängige Wirkungsweise zur Geltung (76). Wie es bereits auch für Trastuzumab und Pertuzumab belegt werden konnte, (64;68) zeichnet sich aus den vorliegenden Daten für die Zelllinie BT474 ebenso eine höhere Sensitivität gegenüber der therapeutischen Substanz Lapatinib ab als für SK-BR-3 Zellen, die sich nicht nur in einem höheren G_0 -Exit, sondern ebenso in einer sehr viel geringeren Regenerationsfähigkeit äußert. Diese Tatsache könnte zumindest teilweise in einem unterschiedlichen EGFR-Koexpressionslevel beider Zelllinien begründet sein (67). Zum anderen könnten die Unterschiede in der Effizienz der Anti-Her2-Therapien auf unterschiedlicher Ebene von Signalmolekülen und –prozessen vollzogen werden und sollten in den folgenden Kapiteln unter diesem Aspekt eingehender beleuchtet werden.

6.3 DIE INDUKTION DER APOPTOSE DURCH BEHANDLUNGEN MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

Die dynamischen Proliferationsanalysen zur modular gestalteten Tumorthherapie aus Kap. 6.1 weisen stark auf eine Potenzierung des Anti-Tumor-Effekts einzelner Antigen-spezifischer Reagenzien durch ihre Kombination mit einer weiteren *target*-spezifischen Substanz hin. Besonders die Kombinationsbehandlungen der monoklonalen Antikörper mit einem *small molecule* TKI zeugen von einer vielversprechenden synergistischen Wirkung, die nicht nur hinsichtlich ihrer Proliferationsinhibition, sondern auch in Bezug auf ihre pro-apoptotische Potenz weiter untersucht werden sollte. Ähnliche Strategien konnten bereits in ErbB1 überexprimierenden Tumorzellen aus einer eben solchen Kombination eine gesteigerte Anti-Tumor-Wirkung verzeichnen (81), die nun auch im Fall von Her2/neu überexprimierenden Mammakarzinomzellen weiter diskutiert werden soll.

▪ Die Annexin-V-FITC Untersuchungen zur Zelllinie BT474

Bei den BT474 Mammakarzinomzellen liegt die Fraktion unbehandelter apoptotischer Zellen mit durchschnittlichen 8,6% relativ hoch. Zur Determination von apoptotischen Zellfraktionen muss daher zusätzlich ein Abgleich mit dem unter Camptothecin-Behandlung auftretenden Apoptosegehalt dienen. Anhand dieser Orientierungsgrundlage wird sehr schnell ersichtlich, dass von den monoklonalen Antikörpern in alleiniger oder miteinander kombinierter Anwendung sowohl nach 48 h als auch nach 96 h keinerlei pro-apoptotischer Stimulus ausgeht. Auch bei Brockhoff et al. wird dem bei einer Antikörperbehandlung durch Apoptose induzierten Zelltod keine signifikante Rolle in untersuchten BT474 Zellen zugeschrieben (64). An anderer Stelle in der Literatur wird allerdings sehr wohl über ein durch die gemeinsame Anwendung von Trastuzumab und Pertuzumab gesteigertes Apoptoseverhalten der Zelllinie BT474 berichtet. Allerdings traten dort signifikante Änderungen erst bei unphysiologisch hohen Werten im Bereich von 100 µg/ml, also dem Zehnfachen der Konzentrationen für die vorliegende Studie, auf und könnten so die aufgetretenen Diskrepanzen erklären (44). Bei einer 48- oder auch 96-stündigen Lapatinib-Behandlung manifestiert sich für BT474 Zellen eine deutlich stärkere Apoptoserate als bei der Camptothecin-Behandlung und bestätigt so die in der Literatur für ErbB2 überexprimierende Zelllinien vielfach angesprochene pro-apoptotische Potenz des TKIs (47;48;76). Für beide Behandlungszeitpunkte stellt sich sogar eine Verstärkung dieses von Lapatinib ausgehenden Effekts durch eine Erweiterung der Behandlung auf die monoklonalen Antikörper ein, wie es am deutlichsten an den über 48 h durchgeführten jeweiligen Kombinationsbehandlungen ersichtlich ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit einer Publikation von Xia et al., die für Lapatinib alleine einen leichten Anstieg apoptotischer Zellen beschreibt, in Kombination mit Anti-ErbB2-Antikörpern, wie z.B. Trastuzumab, jedoch eine deutliche Steigerung dieser pro-apoptotischen Tendenz beobachtet. Dort wird die Tumorzellapoptose durch Lapatinib mit einer Inhibition des Proteins Survivin in Verbindung gebracht, einem Mitglied der Apoptoseinhibitorfamilie, die Tumorzellen vor dem programmierten Zelltod schützen (81). Erstmals kann in der vorliegenden Studie jedoch auch ein Synergismus von Lapatinib mit dem monoklonalen Antikörper Pertuzumab im Hinblick auf die pro-

apoptotische Potenz belegt werden, der in seiner Effektivität der Kombinationsbehandlung von Lapatinib und Trastuzumab gleichkommt. Damit bestätigt sich auch für die Apoptosebestimmungen die schon für die dynamischen Proliferationsuntersuchungen gültige Feststellung, dass von einer Kombination Lapatinibs mit beiden monoklonalen Antikörpern eine Potenzierung des alleinigen Anti-Tumor-Effekts des dualen TKIs ausgeht (vgl. Kap. 6.1). Die Abnahme der Apoptosefraktionen bei den 96 h-Behandlungen gegenüber den 48 h-Werten erscheint unlogisch und muss wohl auf die Handhabung in der Zellkultur zurückgeführt werden. Während für die 48 h-Bestimmungen die Zellen mit den inhibitorischen Substanzen bis zur Ernte inkubiert werden konnten, stand für die 96 h-Untersuchungen nach 48 h ein Mediumwechsel mit Erneuerung der Anti-Tumor-Substanzen an. Eventuell bereits apoptotische und abgeschwommene Zellen könnten so mit dem Medium entfernt worden und daher nicht in die zugrunde liegende Messung eingegangen sein. Außerdem könnten so möglicherweise resistenter Zellen einen Selektionsvorteil erhalten haben und die Abnahme der Apoptosefraktionen bedingen.

▪ Die Annexin-V-FITC Untersuchungen zur Zelllinie SK-BR-3

Für SK-BR-3 Zellen liegt der Anteil unbehandelter apoptotischer Zellen mit durchschnittlichen 18% noch höher als bei BT474 Zellen. An dieser Stelle muss kritisch angemerkt werden, dass die Zellen wohl in Kultur, eventuell durch eine Trypsin-Behandlung oder andere Zellkulturschritte eine Vorschädigung erfahren haben. Bei der normierten Darstellung aus Kap. 5.3 handelt es sich demnach um vielfache Werte einer relativ hohen Ausgangsgröße. Auch hier erleichtert die Positivkontrolle mit Camptothecin die Identifizierung pro-apoptotischer Entwicklungen. Wieder lösen auch bei SK-BR-3 Zellen die monoklonalen Antikörper in alleiniger oder kombinierter Anwendung zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen bedeutsamen Apoptosestimulus aus und bestätigen damit die Voruntersuchungen von Brockhoff et al. (64). Tendenziell lässt sich zwar eine gesteigerte Apoptoserate bei einer 48- bzw. 96-stündigen Inkubation der SK-BR-3 Zellen mit Lapatinib alleine oder einer Kombination mit den Antikörpern beobachten, die Unterschiede sind jedoch weitaus weniger markant als bei BT474 Zellen. Eine deutlich erhöhte Apoptosefraktion im Bereich der Positivkontrolle stellt sich erst bei einer über 96 h kombinierten Behandlung der SK-BR-3 Zellen mit Lapatinib und Trastuzumab bzw. Pertuzumab ein und verweist so ein weiteres Mal auf die erhöhte Effektivität von Kombinations- gegenüber Einzelbehandlungen. Im Gegensatz zu den BrdU/Hoechst-*Quenching* Versuchen, bei denen sich der Anti-Tumor-Effekt Lapatinibs für SK-BR-3 Zellen lediglich durch Pertuzumab verstärken ließ (vgl. Kap. 6.1), stellt sich hier eine gleichermaßen gesteigerte Apoptoserate für die Kombinationen von Lapatinib mit beiden monoklonalen Antikörpern ein. Auch bei der für SK-BR-3 Zellen im Vergleich zu BT474 geringer ausgeprägten, aber dennoch merklich gesteigerten Induktion der Apoptose durch die Kombinationen des TKIs mit Anti-Her2-Antikörpern handelt es sich um ein vorbeschriebenes Phänomen (81), das ein weiteres Mal die geringere Sensitivität der SK-BR-3 Zellen auch im Hinblick auf ihr Apoptoseverhalten untermauert. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden Zelllinien besteht im Anstieg der Apoptosefraktionen von SK-BR-3 Zellen bei einer Verlängerung des Inkubationszeitraumes, auf den BT474 Zellen sogar mit einem Abfall reagiert hatten. Offensichtlich wird bei der Zelllinie SK-BR-3 der Apoptoseprozess über andere Mechanismen vollzogen. Eventuell befanden sich

zum Zeitpunkt des Mediumwechsels die Zellen noch adhären am Flaschenboden, zu dem sich BT474 Zellen bereits abgelöst hatten. Damit könnte sich erneut ein Hinweis auf die unterschiedliche Sensitivität beider Zelllinien und somit eine Ursache für ihr unterschiedliches Ansprechen auf die verschiedenen Anti-Her2-Therapien ergeben. Berücksichtigt man die Angaben in der Literatur zum Apoptoseverhalten von SK-BR-3 Zellen bei 100 nM Lapatinib, so ist zu erwarten, dass eine Erhöhung der Inhibitorkonzentration von 10 nM auf 100 nM mit einem weiteren Anstieg der apoptotischen Zellfraktionen einhergehen würde (48).

Die Zusammenschau aus den dynamischen Prolifations- und Annexin-V-FITC Versuchen legt für Lapatinib einen sowohl deutlich anti-proliferativen als auch einen – wenn auch weniger stark ausgeprägten – pro-apoptotischen Wirkmechanismus zugrunde. Anhand der vorliegenden Studie können die Effekte der mAbs mehr auf der proliferativen als auf der apoptotischen Seite vermutet und erklärt werden und besitzen damit eher zytostatischen als zytotoxischen Charakter (64). Dennoch können sie, wie auch schon bei den Proliferationsanalysen beobachtet, als Kombinationspartner die Anti-Tumor-Wirkung Lapatinibs weiter verstärken (58). Für einen optimalen additiven Effekt wären als weitere Kombinationspräparate zu Lapatinib eventuell direkt pro-apoptotische Agentien zu erwägen.

6.4 DIE PHOSPHORYLIERUNG WICHTIGER REZEPTOR- UND SIGNALPROTEINE BEI VERSCHIEDENEN ANTI-HER2-THERAPIEN

6.4.1 Die EGF- und c-erbB2-Rezeptorphosphorylierung

Für die c-erbB2-Rezeptoranalyse wurden die Tyrosinreste 1221/1222 im Hinblick auf ihre Phosphorylierung untersucht, da sie als wichtige Autophosphorylierungsstellen die Kopplung des ErbB2 and den Ras-MAPK-Signalweg vermitteln (82). Die Abbildungen der Western Blots aus Kap. 5.4 weisen für beide Zelllinien auf die konstitutive Expression eines phosphorylierten ErbB2-Proteins hin (76), in der die Grundvoraussetzung für eine Sensitivität gegenüber der therapeutischen Substanz Trastuzumab gesehen wird und die so den Weg für eine effektive Antikörperbehandlung ebnet (83). Die für beide Zelllinien durch eine Therapie mit den Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab eingeleitete Rezeptorphosphorylierung erscheint zunächst paradox, da sie üblicherweise mit der Induktion mitogener und damit pro-proliferativer Signale in Verbindung gebracht wird. Tatsächlich konnte jedoch gezeigt werden, dass eine durch Trastuzumab hervorgerufene Rezeptorphosphorylierung nicht a priori einen mitogenen Stimulus ins Zellinnere bedeuten muss, sondern sogar maßgeblich an der Vermittlung der Proliferationsinhibition beteiligt ist (68). In der Literatur wird diese agonistische Komponente Trastuzumabs mit der Imitation einer Liganden-induzierten c-erbB2-Phosphorylierung und nachfolgender PI3K-Aktivierung verglichen, die dann allerdings in eine Rezeptor-*Downregulation* mit assoziierter Wachstumsinhibition (vgl. Kap. 5.1) mündet (84). Die vorliegenden Western Blot Untersuchungen zeigen für den Antikörper Pertuzumab trotz der Bindung eines unterschiedlichen c-erbB2-Epitops (85) eine identische Tendenz und lassen darauf schließen, dass auch sein Wirkmechanismus zumindest zum Teil auf den gleichen

fundamentalen Prinzipien beruht. Auch wenn die oben genannte Rezeptorstimulation meist für Antikörper-Behandlungen über wenige Minuten bis Stunden postuliert wird (84), so bleibt sie offenbar auch nach einer 24-stündigen Inkubation beider Zelllinien mit den therapeutischen Antikörpern weiterhin erkennbar. Nahta et al. fanden nach fünftägiger Antikörperexposition der BT474 Zellen eine starke *Downregulation* des Phospho-Her2-Rezeptors nur durch eine kombinierte Trastuzumab/Pertuzumab-Behandlung (44). Gleiches stellt sich auch nach nur 24 h bei der Zelllinie BT474 ein, wohingegen SK-BR-3 Zellen durch diese Zweierkombination weiterhin eine Stimulation des Phospho-Rezeptors erfahren, allerdings in geringerem Ausmaß als mit den monoklonalen Antikörpern alleine. Hier ergibt sich für beide Zelllinien ein erster Baustein für eine durchaus effektive Trastuzumab/Pertuzumab-Behandlung, der allerdings für BT474 Zellen stärker zur Geltung kommt (64). Für die inhibitorische Aktivität Lapatinibs fanden O'Brien et al. eine enge Assoziation zur c-erbB2-Überexpression selbst als auch zur Stärke der basalen c-erbB2-Rezeptorphosphorylierung (86). Für beide Zelllinien sind demnach beide Grundvoraussetzungen für eine effektive Lapatinib-Behandlung erfüllt, die sich in einer deutlichen Deaktivierung des Phospho-Her2-Rezeptors mit Hilfe des dualen c-erbB1/c-erbB2 TKIs widerspiegelt. Selbst unter dem simultanen Einsatz von monoklonalen Antikörpern, von denen per se ein Pro-Phosphorylierungseffekt ausgeht, bleibt die Inhibition am phosphorylierten Her2-Rezeptor bestehen. Damit findet sich ein weiterer Beleg für eine additive Inhibition von Lapatinib und den Her2-spezifischen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab.

Im Gegensatz zum c-erbB2-Rezeptor unterscheiden sich BT474 und SK-BR-3 Zellen sowohl hinsichtlich ihres Gehalts an Gesamt-EGFR als auch in Bezug auf ihren phosphorylierten EGF-Rezeptor. SK-BR-3 Zellen verfügen zwar über mehr c-erbB1-Rezeptoren als BT474 Zellen (67), bei der Betrachtung des Phospho-Rezeptors verhält es sich jedoch gegenteilig (vgl. Kap. 5.4) (76). Diese Beobachtung entspricht aktuellen Erkenntnissen der Wissenschaft, nach denen das Level der EGFR-Expression weder mit dem Ansprechen auf EGFR-Inhibitoren noch mit einer EGFR-Aktivierung selbst direkt assoziiert ist (76). Vielmehr wurde aber für zunehmende Mengen an phosphoryliertem EGF-Rezeptor ein verbessertes Ansprechen auf eine Behandlung mit dem TKI Lapatinib gefunden (86). Auch dieser Aspekt beleuchtet eine weitere Facette im unterschiedlichen Therapieverhalten beider Zelllinien und stellt BT474 Zellen ein weiteres Mal als die sensitiveren heraus. Für beide Zelllinien ist anhand der Western Blot Abbildungen eine deutliche Abnahme der EGFR-Phosphorylierung am Tyrosin 1173 für jede der Behandlungen zu erkennen (vgl. Kap. 5.4). Die vorliegende Studie zeigt deutlich, dass die für die Antikörper typische Liganden-gleiche Rezeptoraktivierung nur für den c-erbB-2-Rezeptor zutrifft (68), die Phosphorylierung am EGFR hingegen wohl aufgrund einer verminderten c-erbB2-Heterointeraktion bzw. vermehrten c-erbB2-Homoassoziation unter Pertuzumab- bzw. Trastuzumab-Behandlung abgenommen haben könnte (38;79;85). Auch eine duale Tyrosinkinaseinhibition durch Lapatinib alleine (76) oder simultan zum Antikörpereinsatz kann den Phosphorylierungszustand am EGF-Rezeptor bei beiden Zelllinien bedeutend herunter regeln.

6.4.2 Die Phosphorylierung der Signalproteine AKT und ERK1/2

Da es infolge einer Antikörperbehandlung zunächst bei beiden Zelllinien zu einer Zunahme der c-erbB2-Rezeptorphosphorylierung kommt, ist es nicht verwunderlich, dass gleichzeitig auch das Aktivitätsniveau des weiter *downstream* gelegenen AKT-Proteins unter den gleichen Bedingungen einen leichten Anstieg erfährt. Eine markante Stimulation ist allerdings jeweils nur unter Pertuzumab-Behandlung erkennbar. Für die kombinierte Anwendung beider monoklonaler Antikörper lässt sich wie auch schon beim c-erbB2-Rezeptor eine Tendenz zur Deaktivierung des Signalproteins AKT erkennen, die nun allerdings bei SK-BR-3 Zellen mit einer Reduktion auf 64% stärker ausfällt als bei den neutral aktivierten BT474 Zellen. Die Analyse der Her2-Rezeptorphosphorylierung hatte für diese Kombinationsbehandlung ein genau umgekehrtes Inhibitions muster beider Zelllinien ergeben (vgl. Kap. 6.4.1). Allgemein lässt sich wohl aber sagen, dass ein 24-stündiger Inkubationszeitraum für die Identifikation einer eindeutigen AKT-Deaktivierung infolge einer Antikörperbehandlung nicht ausreichend ist und längerfristig untersucht werden müsste. Einige Quellen beschreiben nämlich durchaus nach einem Behandlungszeitraum von 72 h eine bedeutende Inhibition des AKT-Signalweges aufgrund einer alleinigen oder insbesondere kombinierten Trastuzumab- und/oder Pertuzumab-Behandlung (44;81). Bei Lapatinib korreliert hingegen der prompte inhibitorische Effekt auf die c-erbB2-Phosphorylierung bei beiden Zelllinien mit einer gleichermaßen reduzierten AKT-Phosphorylierung (48;76;86), unabhängig von der weiteren An- oder Abwesenheit der monoklonalen Antikörper. Eine effektive Deaktivierung des AKT-Signalweges infolge einer Lapatinib- und kombinierten Lapatinib/Antikörper-Behandlung steht so in engem Zusammenhang mit einer Inhibition im *survival-pathway* und einem konsekutiven Anstieg apoptotischer Zellen, wie es auch in Kap. 5.3 beschrieben wurde.

Bei der Untersuchung des Ras-MAPK-Signalweges ist für keine der verschiedenen Einzel- und Kombinationsbehandlungen eine klare Inhibition des Proteins Phospho-ERK1/2 zu erkennen. Unter Antikörperbehandlung ergibt sich bei SK-BR-3 Zellen nach 24 h sogar eine Steigerung in der ERK1/2-Phosphorylierung auf bis zu 150%, bei BT474 Zellen unter kombinierter Trastuzumab/Pertuzumab-Behandlung sogar bis auf 180%. Offensichtlich erfahren beide Mammakarzinomzelllinien durch eine Antikörperbehandlung ebenso eine initiale Stimulation im Ras-MAPK-Signalweg, der nach 24 h weiterhin erkennbar bleibt und selbst durch eine duale Antikörperbehandlung im Gegensatz zur Phosphorylierung von Her2 und AKT keinerlei Tendenz zur Deaktivierung aufweist. Diese Beobachtung wird auch in Publikationen von Nahta und Xia beschrieben, die innerhalb einer sogar 72-stündigen Trastuzumab- und/oder Pertuzumab-Behandlung trotz der durchflusszytometrisch ermittelten Proliferationsinhibition keine bedeutende ERK1/2-Dephosphorylierung nachweisen konnten. Die Autoren verbleiben mit einem Verweis auf die Wahl der Inkubationszeitpunkte, die für die kinetische Regulation im Ras-MAPK-Signalweg einen bedeutenden Einfluss haben könnte (44;81). In der vorliegenden Studie ergibt sich auch für die Detektion von Phospho-ERK1/2 durch eine 24-stündige Behandlung der BT474 und SK-BR-3 Zellen mit 100 nM Lapatinib bzw. Lapatinib/mAb keine bedeutende Regulation. Zahlreiche Autoren beschreiben jedoch für Lapatinib eine signifikante Inhibition der Signalmoleküle im Ras-MAPK-Signalweg, verwenden dafür allerdings deutlich höhere Lapatinibkonzentrationen im Bereich von 1-5 μ M (47;76) und beginnen die Lyse z.T.

bereits nach nur einer Stunde Inkubationszeit (76). Publierte Untersuchungen zur Inhibition von Phospho-ERK1/2 durch nur 100 nM Lapatinib basieren oftmals auf einem deutlich längeren Expositionszeitraum von bis zu 72 h (81). Insgesamt betrachtet zeigt sich also auch insbesondere in den Untersuchungen zur Ras-MAPK-Regulation die in Kap. 6.2 angesprochene dosis- und zeitabhängige Wirkungsweise Lapatinibs (76). Eine weitere mögliche Ursache für die ausbleibenden *downstream* Effekte auf die ERK 1/2-Phosphorylierung durch eine duale c-erbB1/c-erbB2-Inhibition könnte ebenso in der komplizierten Kinetik des MAPK-Signalwegs selbst begründet sein. Minuten- bis stundenlange Oszillationen in der Proteinphosphorylierung mit begleitender wellenförmiger Diffusion von Phospho-Proteinen sind bekannte Phänomene (87) und könnten auch in der vorliegenden Western Blot Analyse eine stattfindende Inhibition durch Lapatinib zum Untersuchungszeitpunkt verschleiern. Eine signifikante anti-mitogene Wirkungsweise Lapatinibs konnte jedoch durch die dynamischen Proliferationsanalysen aus Kap. 5.1 beschrieben werden und würde in enger Verbindung zu einer Inhibition im verantwortlichen Ras-MAPK-Signalweg stehen. Daher kann aufgrund der vorliegenden Western Blot Ergebnisse nicht generell von einer fehlenden Deaktivierung der zur MAPK-Kaskade gehörigen Proteine durch Lapatinib gesprochen werden, sondern es muss umso mehr auf die zeit- und dosisabhängige Komponente Lapatinibs sowie die kinetische Regulation im Signalweg selbst eingegangen werden.

6.5 ANALYSEN ZUM *CELL SIGNALING* BEI BEHANDLUNGEN MIT LAPATINIB, TRASTUZUMAB UND PERTUZUMAB

6.5.1 Die Inhibition von Signalmolekülen unter verschiedenen Anti-Her2-Therapien bei BT474 und SK-BR-3

▪ Der Phospho-Kinase Antikörper-Array zur Zelllinie BT474

Der Antikörper-Array wie auch die Western Blot Analysen zum Aktivitätsmuster von Phospho-AKT an der Serinstelle 473 reflektieren in gleicher Weise eine durch Lapatinib alleine und in Kombination mit den monoklonalen Antikörpern erzielte Inhibition auf bis zu 40%. Wenngleich eine im Western Blot erkennbare Antikörper-Stimulation im Array ausbleibt, so ergibt sich auch hier, sowie zusätzlich für die Phosphorylierungsstelle T308, eine deutliche Abgrenzung aller Behandlungen von Pertuzumab, unter dessen Einfluss sich keinerlei inhibitorischer Effekt einstellt. Ein ähnliches Inhibitionsmuster zeigt sich ebenso für die Phosphorylierungsstelle Ser2448 des Signalproteins mTOR (*mammalian target of rapamycin*), einer *downstream* gelegenen Zielstruktur der PI3-Kinase. mTOR gilt als Koordinator von Zellwachstum und Homöostase und transduziert seine Signale zur p70 S6 Kinase, die ihrerseits als wichtiges Regulatorprotein von Proteintranslation und Zellwachstum fungiert und in einer Art *feedback*-Schleife die Phosphorylierung am Ser2448 von mTOR mitbeeinflussen kann (88;89). Der translationale Apparat erfährt so durch jeden Behandlungsansatz außer durch Pertuzumab eine starke Inhibition über die Rapamycin-sensitiven Phosphorylierungsstellen T229 und T389 der p70 S6 Kinase. Noch stärker kristallisiert sich sogar der Unterschied zwischen dem Antikörper

Pertuzumab und allen übrigen Behandlungen bei der Betrachtung des Expressionslevels von β -Catenin heraus. Für Trastuzumab wurde für ErbB2 überexprimierende Brustkrebszellen erst kürzlich ein inhibitorischer Effekt über eine neue Signalachse, die ErbB2- β -Catenin/TCF4-Survivin-Kaskade beschrieben, der ein wesentlicher Einfluss auf die Zellproliferation und Apoptose zugesprochen wird (90). Doch nicht nur unter Trastuzumab-Behandlung, sondern auch unter dem Einfluss von Lapatinib, der Kombination mit monoklonalen Antikörpern oder dem simultanen Einsatz beider Antikörper manifestiert sich eine bedeutende Abnahme der β -Catenin-Expression. Diese Beobachtungen zu den oben beschriebenen wichtigen Regulatorproteinen von Zellteilung und -überleben sind kongruent mit den Erkenntnissen aus den Annexin-V-FITC und den dynamischen Proliferationsuntersuchungen. Dort konnte eine alleinige Pertuzumab-Behandlung nur einen geringgradigen G_0 -Exit und keinerlei apoptotische Tendenzen in BT474 Zellen induzieren, eine Sensitivität gegenüber Trastuzumab, Lapatinib und den Kombinationsbehandlungen war jedoch bereits klar erkennbar (vgl. Kap. 5.1 bis 5.4).

Weiterhin erfahren bei BT474 Zellen die als Onkogene geltenden Signalproteine STAT3 und STAT5a (*signal transducers and activators of transcription*) in den *target*-spezifischen Behandlungen durch Lapatinib, Trastuzumab und auch Pertuzumab eine massive Abnahme ihrer Tyr705- bzw. Tyr699-Phosphorylierung auf bis zu 50%. Der durch einzelne Substanzen erzielte Erfolg kann dabei durch das Hinzufügen einer weiteren Anti-Her2-spezifischen Behandlung gesteigert werden und so die Dimerisierung und nukleäre Translokation von STAT-Proteinen und ihre nachfolgende Aktivierung von pro-proliferativen, pro-angiogenetischen und anti-apoptotischen Genen noch effektiver verhindern (91). In gleicher Weise gestaltet sich das durch die verschiedenen Behandlungsansätze hervorgerufene Inhibitions muster der als indirekte Aktivatoren der JAK-/STAT-Kaskade geltenden Src-Kinase-Mitglieder, wie z.B. Src, Lyn, Fyn und Fgr (91).

Auch für die Signalproteine des Ras-MAPK-Weges gibt es bei BT474 Zellen über nennenswerte Besonderheiten zu berichten. Berücksichtigt man einen Treshold von 25%, so gibt der Antikörper-Array für die Behandlungen von Trastuzumab und Lapatinib alleine bzw. kombiniert mit den Antikörpern eine Inhibition von Phospho-ERK1/2 zu erkennen, die im Western Blot nicht aufgetreten war. Dennoch wird anhand des Unterschiedes zum stärker inhibierten Phospho-AKT-Protein (Ser473) auch klar ersichtlich, dass der PI3K-Signalweg wesentlich stärker auf die verschiedenen Einzel- und Kombinationsbehandlungen anspricht. Zudem vermittelt die Darstellung multipler Signalproteine aus dem Antikörper-Array Einblicke in die komplexe Regulation des MAPK-Signalweges selbst. Während auf übergeordneter Ebene von Phospho-ERK1/2 eine eindeutige Inhibition mit dem bekannten stufenförmigen Muster auftritt (MEK 1/2), erfahren untergeordnete Mitglieder der Signalkaskade durch die verschiedenen Behandlungsansätze teilweise gar keine Inhibition mehr (RSK1/2, RSK 1/2/3, FAK, Paxillin) (92). In anderen Signalarmen der MAPK-Kaskade, wie in den für die Stressantwort verantwortlichen Regulatorproteinen JNK (T183/Y185, T221/Y223) und p38 α (T180/Y182), treten hingegen wiederum besonders für die Kombinationsbehandlungen deutliche Inhibitionen auf. Überraschenderweise wird also keine Stressantwort der Zellen angeworfen, möglicherweise weil keine gravierende Zellschädigung z.B. durch eine Inflammation oder ionisierende Strahlung vorliegt (92).

Ebenso überraschend erfahren die zu p53 gehörigen Phosphorylierungsstellen S15, S392 und S46 unter Behandlung eine massive Deaktivierung, obwohl die Funktion des Tumorsuppressorgens in einer durch Phosphorylierung aktivierten Induktion von Zellzyklusarrest und Apoptose infolge von DNA-Schädigungen begründet ist (93). An dieser Stelle muss auf die bei BT474 Zellen auftretende „*gain of function*“ Mutation von p53 mit funktioneller Defizienz und folglich unkontrollierter Zellproliferation verwiesen werden (94), die so eine p53-Inhibition durch Anti-Tumor-Substanzen durchaus plausibel erscheinen lässt. Während S15 durch Lapatinib, Lapatinib/Pertuzumab und Trastuzumab/Pertuzumab die effektivste Dephosphorylierung erfährt, charakterisieren sich die beiden anderen untersuchten Phosphorylierungsstellen (S392, S46) eher durch ein von Trastuzumab dominiertes Inhibitionsmuster, bei dem nur Trastuzumab selbst oder in Kombination mit Lapatinib bzw. Pertuzumab eine bedeutende Proteindeaktivierung erzielen kann. Auch für die Phosphorylierung von T198 des als negativer Regulator der G₁-S-Progression geltenden Tumorsuppressorgens p27 findet sich ebenfalls nur eine Inhibition durch Trastuzumab und Trastuzumab-haltige Kombinationen. In der Literatur wird für T198 eine Phosphorylierung durch die PI3K mit nachfolgender Stabilisierung von p27-Cyclin D1-Cdk4-Komplexen beschrieben, die eine verminderte Inhibition von Cyclin E-Cdk2 durch p27 mit konsekutiv vermehrtem S-Phase Eintritt der Zellen bis hin zur malignen Transformation nach sich ziehen könnte (95). An dieser Stelle findet sich somit also ein erneuter Beleg für die hohe Sensitivität der BT474 Zellen gegenüber Trastuzumab alleine (68), oder aber in Kombination mit Lapatinib und auch Pertuzumab (64).

▪ Der Phospho-Kinase Antikörper-Array zur Zelllinie SK-BR-3

Von der Vielzahl der bei SK-BR-3 Zellen eher neutral phosphorylierten Signalproteine grenzt sich besonders der prominente Anstieg von Chk-2 (T68) unter Kombinationsbehandlung der Antikörper untereinander oder mit Lapatinib ab. Hierbei handelt es sich um einen wichtigen Aktivator von Zellzyklus-*Checkpoints* und p53-induzierter Apoptose im Rahmen einer zellulären Stressantwort z.B. bei auftretenden DNA-Schädigungen infolge von Doppelstrangbrüchen (93). Die mit einem Anstieg um das 2,4-fache am stärksten ausfallende Chk-2-Aktivierung durch Lapatinib/Pertuzumab muss dabei die stärkste Betonung erfahren und unterstreicht die Schlüsselrolle dieser Kombination für die Induktion eines effektiven G₀-Exits auch unter Wachstumsfaktorstimulation, wie sie in den dynamischen Proliferationsversuchen zu beobachten war (vgl. Kap.5.1). Der Unterschied zu BT474 Zellen, bei denen keine derartige Stressantwort aufgetreten war, erscheint schlüssig, da für SK-BR-3 Zellen bereits eine im Vergleich stärkere Neigung zu Doppelstrangbrüchen mit nachfolgendem Zelltod durch eine Camptothecin-Behandlung belegt werden konnte (64). Obwohl das Tumorsuppressorgen p53 demnach also zu einer der wichtigsten Zielstrukturen der aktivierten Chk-2 zählt, dokumentiert auch hier der Antikörper-Array eine verminderte Proteinphosphorylierung aller untersuchten Serinreste, die wohl wiederum auf die funktionelle Defizienz des mutierten Proteins zurückzuführen ist (94). Anders als zuvor bei der Zelllinie BT474 erfolgt hier eine effektive Inhibition erst durch eine Kombination von Pertuzumab mit Lapatinib oder Trastuzumab. Dieser Unterschied mag einerseits in einer bei beiden Zelllinien unterschiedlich gestalteten „*gain of function*“ Mutation begründet sein (94). Zum anderen könnte sich aber auch in dieser Untersuchung die verminderte Trastuzumab-Sensitivität der SK-BR-3 Zellen manifestieren und

auf die für SK-BR-3 Zellen in den Proliferationsdaten und Western Blot Analysen ermittelte inhibitorische Kapazität von Lapatinib/Pertuzumab und Trastuzumab/Pertuzumab verweisen (vgl. Kap.5.1 und 5.4). Dies erscheint umso eindrücklicher, weil das Inhibitionsmuster von p27 (T198) der SK-BR-3 Zellen in gleicher Weise wie bei p53 von dem der BT474 Zellen differiert. Dennoch muss auch für die Zelllinie SK-BR-3 kritisch die Diskrepanz zwischen Western Blot und Antikörper-Array im Bezug auf die Inhibition von Phospho-AKT (Ser437) erwähnt werden. Im Array kann nur die Deaktivierung der Phosphorylierungsstelle T308 für manche Behandlungen erahnt werden, nicht aber für Ser437.

6.5.2 Zusammenfassende Betrachtung der Inhibition von Signalmolekülen bei beiden Zelllinien

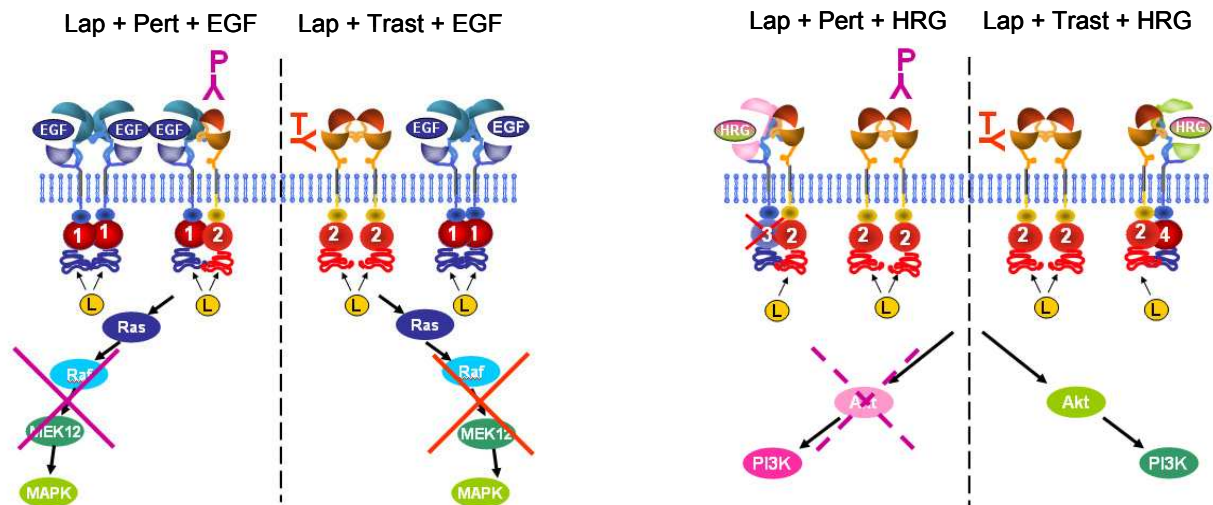
Für die bei beiden Zelllinien an definierten Stellen auftretenden Diskrepanzen zwischen der Western Blot und Array-Analyse müssen die aus den Western Blot Untersuchungen ermittelten Ergebnisse als verlässlicher eingestuft werden. Gleichzeitig legen sie nahe, dass für die Methodik und Auswertung des Proteome Profiler™ Arrays weitere Etablierungsarbeit nötig sein wird. Dennoch besteht kein Anlass, die übrigen Erkenntnisse aus der Antikörper-Array Studie anzuzweifeln, da sie über große Strecken stimmig ins Bild der vorangehenden Untersuchungen passen und deren Grundtenor schlüssig widergeben. So kann die vergleichende Betrachtung multipler Proteine und Signalwege (MAPK, JAK/STAT, β -Catenin, p53, p27) die für viele der Behandlungen generell erhöhte Sensitivität der Zelllinie BT474 schön in den Vordergrund rücken. Zudem besteht eine der wesentlichen Hauptbotschaften des Arrays – wie auch der Proliferations- und Annexin-V-FITC Untersuchungen – in der Erkenntnis, dass Kombinationsbehandlungen die Effektivität von Einzelbehandlungen bedeutend steigern können. Erneut zeichnet sich der simultane Einsatz von Pertuzumab mit Lapatinib oder Trastuzumab als besonders potente Kombination, insbesondere für SK-BR-3 Zellen, ab. Die vorliegenden Daten unterstreichen, dass eine effektive Anti-Tumor-Therapie auf der Ebene zahlreicher, teils auch redundanter Signalwege, vollzogen wird und je nach Zelllinie verschiedene Schlüsselproteine bedient. In BT474 Zellen scheint eine erfolgreiche Anti-Tumor-Behandlung auf der Inhibition des AKT-Signalweges mit den *downstream* gelegenen Schlüsselmolekülen m-TOR/p70 S6 Kinase, von p27, β -Catenin sowie der STAT3/STAT5a-Achse zu beruhen, bei SK-BR-3 Zellen zeichnet sich hingegen ein besonders markanter Anstieg der auf einer Stressantwort beruhenden Chk2-Aktivität ab. Das unterschiedliche Ansprechen beider Zelllinien auf die verschiedensten Arten der *targeted therapy* kann also dementsprechend am unterschiedlichen Muster der inhibierten Signalwege nachvollzogen und begründet werden. Wie schon bei der Untersuchung des Apoptoseverhaltens beider Zelllinien unter Behandlung (vgl. Kap. 6.3) könnte die zusätzliche Inhibition von Signalwegen, z.B. mittels des PI3K-Signalweg-Inhibitors Everolimus (96) eine attraktive Strategie zur Verbesserung des therapeutischen Erfolges darstellen (58).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das unterschiedliche Ansprechen der beiden im Zentrum dieser Arbeit stehenden c-erbB2 überexprimierenden Mammakarzinomzelllinien auf die verschiedenen Arten *target*-spezifischer Therapien wird sehr wahrscheinlich durch ein unterschiedliches EGFR-Koexpressionslevel determiniert und lässt bereits die breite klinische Varianz in der Therapie verschiedenster Tumorsubspezies erahnen. Die vorliegende Arbeit zeigt für beide Zelllinien eine systematische Analyse verschiedenster Antikörper-/TKI-Kombinationen im Hinblick auf ihre inhibitorische und pro-apoptotische Potenz und wird so der Forderung nach einem multimodalen und individualisiert gestalteten Behandlungskonzept gerecht. Die zentralen Kernaussagen dieser Promotionsarbeit beruhen zum einen auf der Erkenntnis, dass der selektivste und effektivste Tumorzellangriff nur durch eine Kombination verschiedener Antigen-spezifischer Behandlungsstrategien erzielt werden kann und zum anderen aber einer entscheidenden Modulation durch die An- und Abwesenheit relevanter Wachstumsfaktoren unterliegt. Auch hier gibt es wiederum Unterschiede im Respons und der Sensitivität beider Zelllinien zu berücksichtigen, die im Folgenden nochmals zusammenfassend dargestellt werden sollen.

Die dynamischen Proliferationsuntersuchungen zu beiden Zelllinien haben gezeigt, dass auch der inhibitorische Mechanismus des TKIs Lapatinib wesentlich auf der Induktion eines hohen G₀-Exits beruht und im Fall von BT474 Zellen – wie auch schon für eine Behandlung mit Trastuzumab – deutlich höher ausfällt. Der Wachstumsfaktor EGF konnte bei beiden Zelllinien einen entscheidenden kompensatorischen Einfluss auf den durch eine antiproliferative Behandlung hervorgerufenen Zellzyklusarrest nehmen, der seinerseits nur durch eine kombinierte Lapatinib/Antikörper-Behandlung reversiert werden konnte. Während sich bei BT474 Zellen die von Lapatinib erzielte Zellzyklusinhibition trotz Stimulation mit EGF durch beide monoklonale Antikörper wiederherstellen ließ, erwies sich bei SK-BR-3 Zellen lediglich eine zusätzliche Behandlung mit dem Antikörper Pertuzumab als effektiv. Trotzdem konnten diese modal gestalteten TKI-/Antikörper-Schemata bei beiden Mammakarzinomzelllinien nie eine durch Heregulin erzielte vollständige Kompensation der Proliferationsinhibition komplett überwinden. Diese Tatsache betont die höhere Potenz von durch Heregulin rekrutierten Her2/Her3- bzw. Her2/Her4-Heterodimeren selbst gegenüber einer dualen und modular gestalteten Tyrosinkinase- und Rezeptorinhibition. Die Ursachen hierfür sind in der molekularen Wirkungsweise der Anti-Tumor-Substanzen zu suchen und legen für Pertuzumab eine vorrangige Inhibition der Her2-Dimerisierung in Richtung EGFR, für Trastuzumab infolge einer zusätzlich gesteigerten Her2-Homoassoziation lediglich einen Inhibitionsvorteil für die an EGF-Rezeptoren ärmeren BT474 Zellen nahe. Separate Untersuchungen nach der „*Quenching* Methode“ wiesen SK-BR-3 Zellen nicht nur als die auch gegenüber dem TKI Lapatinib weniger sensitive Zelllinie aus, sondern demonstrierten auch ihr höheres Erholungspotential nach einer dualen Rezeptorblockade. Zusätzlich konnte durch Untersuchungen mit zwei verschiedenen Lapatinib-Konzentrationen die zeit- und dosisabhängige Wirkungsweise des TKIs in den Vordergrund gerückt werden.

BT474



SK-BR-3

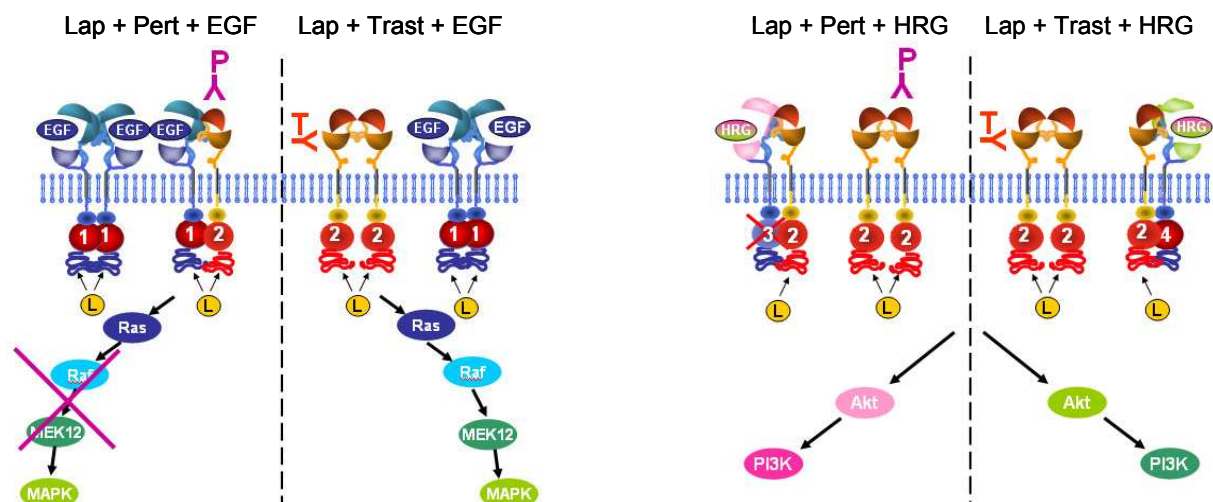


Abbildung 15: Hypothetisches Modell zu den ErbB-Interaktionen unter Wachstumsfaktor- und Inhibitorbehandlung. Die Rezeptoren sind mit Nummern versehen (vgl. Abb.1), die Behandlungen sind über dem jeweiligen Modell angeschrieben; P: Pertuzumab, T: Trastuzumab, L: 100 nM Lapatinib, die Trennlinien kennzeichnen die verschiedenen Lapatinib/Antikörper-Kombinationen; bei einer Stimulation mit EGF kommt es bei BT474 unter Behandlung mit Lapatinib und beiden monoklonalen Antikörpern zu einer erneuten Proliferationsinhibition und Suppression des MAPK-Weges, bei SK-BR-3 nur mit der Kombinationsbehandlung Lapatinib/Pertuzumab. Eine Kompensation durch HRG kann nur bei BT474 partiell durch Lapatinib/Pertuzumab reversiert werden und eine PI3K-Aktivierung beeinflussen, bei SK-BR-3 durch keine der getesteten Behandlungen. Als mögliche Ursache für das unterschiedliche Ansprechen beider Zelllinien ist ihr unterschiedlicher EGFR-Gehalt zu berücksichtigen.

Zum besseren Verständnis der auf einer multipel gestalteten EGFR/ErbB2-Rezeptorblockade beruhenden Mechanismen wurden Annexin-V-FITC Messungen zu verschiedenen Einzel- und

Kombinationsbehandlungen durchgeführt, um möglicherweise erhöhte apoptotische Zellfraktionen zu detektieren. Wie bereits aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Brockhoff bekannt war, konnten durch den singulären oder simultanen Einsatz beider monoklonaler Antikörper keine ansteigenden Apoptosefraktionen in BT474 und SK-BR-3 Zellen induziert werden. Bei einer Lapatinib-Behandlung der Zellen war hingegen eine deutliche Steigerung im Apoptoseverhalten beider Zelllinien zu beobachten, die erneut durch eine zusätzliche Antikörperbehandlung eine wesentliche Verstärkung erfuhr. Unterschiede im Ansprechen beider Zelllinien ergaben sich jedoch nicht nur im Hinblick auf das absolute Ausmaß der induzierten Apoptose, sondern auch in Bezug auf die hierfür nötigen Expositionszeiträume. Erneut gingen auch aus dieser Untersuchung BT474 Zellen als die eindeutig sensitiveren hervor. Als Grundlage für eine effektive Lapatinib-Behandlung von Mammakarzinomzellen muss also nicht nur eine massive Inhibition der Proliferation, sondern auch die Induktion beträchtlicher Apoptoseprozesse angenommen werden.

Auch auf proteinbiochemischer Ebene konnte für beide Zelllinien unter Lapatinib- und Lapatinib/Antikörper-Behandlung eine Reduktion der Her2- und AKT-Phosphorylierung gefunden und mit der Induktion von G₀-Exit und Apoptose in Einklang gebracht werden. Für Trastuzumab und Pertuzumab korrelierte hingegen eine vermehrte c-erbB2-Homoassoziation bzw. unterbundene c-erbB2-Heterodimerisierung mit einer gleichzeitigen c-erbB2- und AKT-Phosphorylierung. Für die kombinierte Anwendung beider monoklonaler Antikörper ergaben sich erste Tendenzen einer Rezeptor- bzw. AKT-Deaktivierung, die darauf hinweisen, dass die kombinierte Anwendung von therapeutischen Antikörpern die intrazelluläre Signalgebung effektiver beeinflussen kann als ihr singulärer Einsatz. Auch für die EGFR-Phosphorylierung ergab sich für jede Art der untersuchten Anti-Tumor-Behandlungen eine Deaktivierung und aufgrund einer stärkeren basalen Ausprägung bei BT474 Zellen ein weiterer Hinweis für ihre erhöhte Lapatinib-Sensitivität. Während unter Antikörper-Behandlung stimulatorische Effekte einer ERK1/2-Phosphorylierung zu beobachten waren, blieb die basale ERK1/2-Aktivierung unter Lapatinib-Behandlung unverändert und betont so die Unterschiede im Ansprechen von Ras-MAPK- und *survival-pathway*. Obwohl also die Effekte einer Lapatinib und Antikörper-Behandlung auf die Aktivierung von Rezeptoren und Signalkaskaden unterschiedlich bis gegenteilig verliefen, blieben ihre inhibierenden Effekte auf die Zellproliferation vergleichbar.

Abschließend konnte anhand einer systematischen Untersuchung des Aktivitätslevels 46 intrazellulärer Signalproteine ein weiteres Mal die wesentlich größere Sensitivität der BT474 Zellen gegenüber den verschiedenen Arten therapeutischer Inhibition untermauert und die gesteigerte Effektivität von Kombinations- gegenüber Einzelbehandlungen demonstriert werden.

Die wahrscheinlichste Ursache für das unterschiedliche Ansprechen beider Zelllinien kann, wie bereits beim Einsatz der monoklonalen Antikörper (64), im unterschiedlichen EGFR-Koexpressionslevel vermutet werden und unterstreicht die von Konecny et al. vorgeschlagene These, dass der stärkste antiproliferative Stimulus des TKI trotz seiner dualen Angriffsweise wohl vorrangig mit seinen Anti-Her2-Effekten assoziiert ist (76). Zusätzlich konnten in der vorliegenden Arbeit weitere Unterschiede auf Rezeptor- und Signalebene beleuchtet werden, die weiterhin für das unterschiedliche Ansprechen ursächlich sein könnten. Letztendlich könnte

eine EGFR-*Down*regulation mittels siRNA eine verstärkte Inhibition bei SK-BR-3 Zellen unter Lapatinib-Behandlung hervorrufen, wie es auch schon bei Brockhoff et al. für den Antikörper Trastuzumab erreicht worden war (64) und somit zur einer gesteigerten Effizienz beitragen.

8 AUSBLICK

Die Her2/neu Überexpression in humanen Mammakarzinomgeweben hat heutzutage einen unangefochten hohen prognostischen Stellenwert und durch die Entwicklung verschiedenster *target*-spezifischer Therapien trotz teilweise Therapieversagen ein generell revolutionär neues Kapitel in der modernen Onkologie eingeleitet. Ein fehlendes Ansprechen kann auf zahlreichen molekularen Resistenzmechanismen (38) beruhen oder aber durch die kompensatorische Rezeptorstimulation durch im Tumorgewebe gleichzeitig anwesende, native Wachstumsfaktoren bedingt sein (77). In den letzten Jahren hat sich zudem der Fokus des Interesses von einer alleinigen Her2 Überexpression zum Koexpressionsmuster weiterer Her-Rezeptoren hin verlagert, die durch essentielle Mechanismen wie Rezeptor-*Crosstalk* und Transaktivierung den Therapieerfolg entscheidend mit beeinflussen können. Eine diagnostische Evaluation des gesamten ErbB-Rezeptor-Koexpressionsprofils wurde daher zur Grundvoraussetzung einer verbesserten Patientenstratifizierung vorgeschlagen (68) und erst kürzlich in der Arbeitsgruppe Brockhoff in einer attraktiven Methode als simultane und quantitative FACS-Analyse aller vier ErbB-Rezeptoren in frischen Brustkrebsgewebeproben beschrieben (97). Statt eines standardisierten Therapiekonzeptes sollte daher vielmehr auf der Basis eines intensiv untersuchten Tumorprofils eine spezifische und individualisierte Behandlungsstrategie für Her2/neu überexprimierende Mammakarzinompatientinnen entworfen werden. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass eine multimodal gestaltete EGFR/Her2-Rezeptorblockade offensichtlich sehr viel nachhaltiger die Her2-Rezeptorfunktion, -aktivierung und -interaktion beeinflussen kann als es nur einzelne Substanzen erreichen. Trotzdem kann eine Wachstumsinhibition durch verschiedene Anti-Tumor-Substanzen auch entscheidend durch Her-Rezeptor eigene Wachstumsfaktoren unterminiert werden, wie es hier anhand der Wachstumsfaktoren EGF und Heregulin gezeigt werden konnte. Eine diagnostische Evaluation Her-spezifischer Wachstumsfaktoren in Tumorproben könnte zur weiteren Patientenstratifizierung und der Optimierung spezifisch patientenorientierter therapeutischer Strategien beitragen. Eine endgültige therapeutische Sequestration nativer Her-Rezeptorliganden in Tumorproben – analog zur Elimination von VEGF durch Bevacizumab – könnte letztendlich eine Sensitivität gegenüber einer Anti-Tumor-Therapie wiederherstellen (58). Als weitere attraktive Option könnte eine spezifisch gegen die ErbB4-Rezeptorfunktion und davon ausgehende Kompensationsmechanismen gerichtete Suppressionstherapie mittels des Antikörpers mAb1479 erwogen werden (98). Wie eng die gegenseitige Transphosphorylierung der ErbB-Rezeptoren mit der Karzinogenese assoziiert ist, konnte in einer Arbeit von Prickett et al. gezeigt werden, bei der Melanomzellen mit mutiertem ErbB4 auf eine Behandlung mit dem dualen ErbB1/ErbB2-TKI Lapatinib mit einem reduzierten Zellwachstum reagierten (99). Die Ergebnisse dieser Arbeit legen also nahe, dass für eine effektive Anti-Tumor-Therapie multiple Angriffsebenen, insbesondere die Rezeptorfunktion und -interaktion, ebenso wie ihre *downstream* gelegenen Signalmoleküle und die Ligandenbindung selbst berücksichtigt werden müssen. Wie also auf dem Feld der *target*-spezifischen Therapien einerseits, so werden andererseits auch auf dem Gebiet der molekularen Grundlagenforschung und der Umgehung von Resistenzmechanismen sehr viele Neuerungen mit Spannung zu erwarten sein.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2010 Jun 25;141(7):1117-34.
- (2) Alroy I, Yarden Y. The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis: signal diversification through combinatorial ligand-receptor interactions. *FEBS Lett* 1997 Jun 23;410(1):83-6.
- (3) Kornfeld K. Vulval development in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Genet* 1997 Feb;13(2):55-61.
- (4) Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004 Mar 1;58(3):903-13.
- (5) Bublil EM, Yarden Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* 2007 Apr;19(2):124-34.
- (6) Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001 Feb;2(2):127-37.
- (7) Kris RM, Lax I, Gullick W, Waterfield MD, Ullrich A, Fridkin M, et al. Antibodies against a synthetic peptide as a probe for the kinase activity of the avian EGF receptor and v-erbB protein. *Cell* 1985 Mar;40(3):619-25.
- (8) Witton CJ, Reeves JR, Going JJ, Cooke TG, Bartlett JM. Expression of the HER1-4 family of receptor tyrosine kinases in breast cancer. *J Pathol* 2003 Jul;200(3):290-7.
- (9) Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
- (10) Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 1980 May 25;255(10):4834-42.
- (11) Citri A, Skaria KB, Yarden Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. *Exp Cell Res* 2003 Mar 10;284(1):54-65.
- (12) Carpenter G. ErbB-4: mechanism of action and biology. *Exp Cell Res* 2003 Mar 10;284(1):66-77.
- (13) Ni CY, Murphy MP, Golde TE, Carpenter G. gamma -Secretase cleavage and nuclear localization of ErbB-4 receptor tyrosine kinase. *Science* 2001 Dec 7;294(5549):2179-81.
- (14) Sundvall M, Iljin K, Kilpinen S, Sara H, Kallioniemi OP, Elenius K. Role of ErbB4 in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2008 Jun;13(2):259-68.
- (15) Elenius K, Choi CJ, Paul S, Santiestevan E, Nishi E, Klagsbrun M. Characterization of a naturally occurring ErbB4 isoform that does not bind or activate phosphatidylinositol 3-kinase. *Oncogene* 1999 Apr 22;18(16):2607-15.

- (16) Sundvall M, Veikkolainen V, Kurppa K, Salah Z, Tvorogov D, van Zoelen EJ, et al. Cell death or survival promoted by alternative isoforms of ErbB4. *Mol Biol Cell* 2010 Dec;21(23):4275-86.
- (17) Massague J, Pandiella A. Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 1993;62:515-41.
- (18) Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 2000 Jul 3;19(13):3159-67.
- (19) Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006 Jul;7(7):505-16.
- (20) Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM, Hynes NE. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997 Apr 1;16(7):1647-55.
- (21) Jorissen RN, Walker F, Pouliot N, Garrett TP, Ward CW, Burgess AW. Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 2003 Mar 10;284(1):31-53.
- (22) Olayioye MA, Graus-Porta D, Beerli RR, Rohrer J, Gay B, Hynes NE. ErbB-1 and ErbB-2 acquire distinct signaling properties dependent upon their dimerization partner. *Mol Cell Biol* 1998 Sep;18(9):5042-51.
- (23) Yarden Y. Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 2001;61 Suppl 2:1-13.
- (24) Mokbel K, Hassanally D. From HER2 to herceptin. *Curr Med Res Opin* 2001;17(1):51-9.
- (25) Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 1995 Jul;19(3):183-232.
- (26) Stauber M, Weyerstahl T. Duale Reihe. Gynäkologie und Geburtshilfe. 3. Auflage. 2007. Stuttgart, Thieme.
- (27) Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 2009 Jul;59(4):225-49.
- (28) King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985 Sep 6;229(4717):974-6.
- (29) Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene* 1996 Jul 4;13(1):63-72.
- (30) Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 1990 Jan;8(1):103-12.
- (31) Revillion F, Bonnetterre J, Peyrat JP. ERBB2 oncogene in human breast cancer and its clinical significance. *Eur J Cancer* 1998 May;34(6):791-808.

- (32) Tsutsui S, Ohno S, Murakami S, Kataoka A, Kinoshita J, Hachitanda Y. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. *Surgery* 2003 Feb;133(2):219-21.
- (33) Sassen A, Rochon J, Wild P, Hartmann A, Hofstaedter F, Schwarz S, et al. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. *Breast Cancer Res* 2008;10(1):R2.
- (34) Lodge AJ, Anderson JJ, Gullick WJ, Haugk B, Leonard RC, Angus B. Type 1 growth factor receptor expression in node positive breast cancer: adverse prognostic significance of c-erbB-4. *J Clin Pathol* 2003 Apr;56(4):300-4.
- (35) Sassen A, Diermeier-Daucher S, Sieben M, Ortmann O, Hofstaedter F, Schwarz S, et al. Presence of HER4 associates with increased sensitivity to Herceptin in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res* 2009;11(4):R50.
- (36) Das PM, Thor AD, Edgerton SM, Barry SK, Chen DF, Jones FE. Reactivation of epigenetically silenced HER4/ERBB4 results in apoptosis of breast tumor cells. *Oncogene* 2010 Sep 16;29(37):5214-9.
- (37) Saxena R, Dwivedi A. ErbB family receptor inhibitors as therapeutic agents in breast cancer: Current status and future clinical perspective. *Med Res Rev* 2010 Oct 25.
- (38) Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2006 May;3(5):269-80.
- (39) Tagliabue E, Balsari A, Campiglio M, Pupa SM. HER2 as a target for breast cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2010 May;10(5):711-24.
- (40) Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001 Mar 15;344(11):783-92.
- (41) Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999 Sep;17(9):2639-48.
- (42) Chang HR. Trastuzumab-based neoadjuvant therapy in patients with HER2-positive breast cancer. *Cancer* 2010 Jun 15;116(12):2856-67.
- (43) Diermeier-Daucher S, Hasmann M, Brockhoff G. Flow cytometric FRET analysis of erbB receptor interaction on a cell-by-cell basis. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1130:280-6.
- (44) Nahta R, Hung MC, Esteva FJ. The HER-2-targeting antibodies trastuzumab and pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells. *Cancer Res* 2004 Apr 1;64(7):2343-6.
- (45) Baselga J, Gelmon KA, Verma S, Wardley A, Conte P, Miles D, et al. Phase II trial of pertuzumab and trastuzumab in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer that progressed during prior trastuzumab therapy. *J Clin Oncol* 2010 Mar 1;28(7):1138-44.
- (46) MacFarlane RJ, Gelmon KA. Lapatinib for breast cancer: a review of the current literature. *Expert Opin Drug Saf* 2011 Jan;10(1):109-21.

- (47) Xia W, Mullin RJ, Keith BR, Liu LH, Ma H, Rusnak DW, et al. Anti-tumor activity of GW572016: a dual tyrosine kinase inhibitor blocks EGF activation of EGFR/erbB2 and downstream Erk1/2 and AKT pathways. *Oncogene* 2002 Sep 12;21(41):6255-63.
- (48) Nahta R, Yuan LX, Du Y, Esteva FJ. Lapatinib induces apoptosis in trastuzumab-resistant breast cancer cells: effects on insulin-like growth factor I signaling. *Mol Cancer Ther* 2007 Feb;6(2):667-74.
- (49) Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini PD, et al. Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin Cancer Res* 2010 May 1;16(9):2688-95.
- (50) Scaltriti M, Verma C, Guzman M, Jimenez J, Parra JL, Pedersen K, et al. Lapatinib, a HER2 tyrosine kinase inhibitor, induces stabilization and accumulation of HER2 and potentiates trastuzumab-dependent cell cytotoxicity. *Oncogene* 2009 Feb 12;28(6):803-14.
- (51) Leary AF, Drury S, Detre S, Pancholi S, Lykkesfeldt AE, Martin LA, et al. Lapatinib restores hormone sensitivity with differential effects on estrogen receptor signaling in cell models of human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer with acquired endocrine resistance. *Clin Cancer Res* 2010 Mar 1;16(5):1486-97.
- (52) Tyverb® Fachinformation, Stand Juli 2010.
- (53) Waggoner A. Fluorescent probes for cytometry. In: *Flow cytometry and sorting*. 2. Auflage. Melamed, MR (ed). 1990. New York, Wiley-Liss.
- (54) http://flow.csc.mrc.ac.uk/?page_id=5.
- (55) <http://health.usf.edu/NR/rdonlyres/E9C6F213-BF6C-4AA4-9A72-0B2612BA1412/27228/CantoManual.pdf>.
- (56) Sack U, Tárnok A, Rothe G. *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendung der Durchflusszytometrie*. 2007. Basel, Karger.
- (57) <http://mi.img.cas.cz/FACS/LSRII/Manuals/LSRII%20Users%20Guide.pdf>.
- (58) Diermeier-Daucher S, Breindl S, Buchholz S, Ortmann O, Brockhoff G. Modular anti-EGFR and anti-Her2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors. *Cytometry A* 2011 Sep;79(9):684-93.
- (59) Howard A, Pelc S. Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. 6[Suppl], 261-273. 1953. *Heredity*.
- (60) Krauss G. *Biochemie und Regulation der Signaltransduktion. das moderne Lehrbuch für Chemiker, Biochemiker, Biologen und Mediziner*. Weinheim, Wiley-VCH.
- (61) http://karesel-kiste.de/kiste/biologie/genetik/genetik_bild/Zellzyklus.jpg.
- (62) Diermeier S, Schmidt-Bruecken E, Kubbies M, Kunz-Schughart LA, Brockhoff G. Exposure to continuous bromodeoxyuridine (BrdU) differentially affects cell cycle progression of human breast and bladder cancer cell lines. *Cell Prolif* 2004 Apr;37(2):195-206.

- (63) Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 5. 2008. New York, Garland Science.
- (64) Brockhoff G, Heckel B, Schmidt-Bruecken E, Plander M, Hofstaedter F, Vollmann A, et al. Differential impact of Cetuximab, Pertuzumab and Trastuzumab on BT474 and SK-BR-3 breast cancer cell proliferation. *Cell Prolif* 2007 Aug;40(4):488-507.
- (65) Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994 Sep 1;84(5):1415-20.
- (66) http://www.rndsystems.com/pdf/ta4638_5532.pdf.
- (67) Brockhoff G, Heiss P, Schlegel J, Hofstaedter F, Knuechel R. Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. *Cytometry* 2001 Aug 1;44(4):338-48.
- (68) Diermeier S, Horvath G, Knuechel-Clarke R, Hofstaedter F, Szollosi J, Brockhoff G. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. *Exp Cell Res* 2005 Apr 1;304(2):604-19.
- (69) European Collection of Animal Cell Culture.
- (70) Classen S, Possinger K, Pelka-Fleischer R, Wilmanns W. Effect of onapristone and medroxyprogesterone acetate on the proliferation and hormone receptor concentration of human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1993 Apr;45(4):315-9.
- (71) Kumar R, Mandal M, Ratzkin BJ, Liu N, Lipton A. NDF induces expression of a novel 46 kD protein in estrogen receptor positive breast cancer cells. *J Cell Biochem* 1996 Jul;62(1):102-12.
- (72) Sutherland RL, Hall RE, Pang GY, Musgrove EA, Clarke CL. Effect of medroxyprogesterone acetate on proliferation and cell cycle kinetics of human mammary carcinoma cells. *Cancer Res* 1988 Sep 15;48(18):5084-91.
- (73) <http://www.piercenet.com/browse.cfm?fldID=876562B0-5056-8A76-4E0C-B764EAB3A339>.
- (74) Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- (75) http://www.rndsystems.com/DAM_public/5598.gif.
- (76) Konecny GE, Pegram MD, Venkatesan N, Finn R, Yang G, Rahmeh M, et al. Activity of the dual kinase inhibitor lapatinib (GW572016) against HER-2-overexpressing and trastuzumab-treated breast cancer cells. *Cancer Res* 2006 Feb 1;66(3):1630-9.
- (77) Revillion F, Lhotellier V, Hornez L, Bonnetterre J, Peyrat JP. ErbB/HER ligands in human breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol* 2008 Jan;19(1):73-80.
- (78) Motoyama AB, Hynes NE, Lane HA. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth factor-related peptides. *Cancer Res* 2002 Jun 1;62(11):3151-8.

- (79) Hughes JB, Berger C, Rodland MS, Hasmann M, Stang E, Madshus IH. Pertuzumab increases epidermal growth factor receptor down-regulation by counteracting epidermal growth factor receptor-ErbB2 heterodimerization. *Mol Cancer Ther* 2009 Jul;8(7):1885-92.
- (80) Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE. Neu differentiation factor induces ErbB2 down-regulation and apoptosis of ErbB2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res* 1997 Sep 1;57(17):3804-11.
- (81) Xia W, Gerard CM, Liu L, Baudson NM, Ory TL, Spector NL. Combining lapatinib (GW572016), a small molecule inhibitor of ErbB1 and ErbB2 tyrosine kinases, with therapeutic anti-ErbB2 antibodies enhances apoptosis of ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Oncogene* 2005 Sep 15;24(41):6213-21.
- (82) Data sheet #2243. Phospho-Her2/ErbB2 (Tyr1221/1222) (6B12) Rabbit mAb. 2010. Beverly, MA, USA, Cell Signaling Technology, Inc.
- (83) Ginestier C, Adelaide J, Goncalves A, Repellini L, Sircoulomb F, Letessier A, et al. ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene* 2007 Nov 1;26(50):7163-9.
- (84) Scott GK, Dodson JM, Montgomery PA, Johnson RM, Sarup JC, Wong WL, et al. p185HER2 signal transduction in breast cancer cells. *J Biol Chem* 1991 Aug 5;266(22):14300-5.
- (85) Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005 May;5(5):341-54.
- (86) O'Brien NA, Browne BC, Chow L, Wang Y, Ginther C, Arboleda J, et al. Activated phosphoinositide 3-kinase/AKT signaling confers resistance to trastuzumab but not lapatinib. *Mol Cancer Ther* 2010 Jun;9(6):1489-502.
- (87) Kholodenko BN. Negative feedback and ultrasensitivity can bring about oscillations in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Eur J Biochem* 2000 Mar;267(6):1583-8.
- (88) Chiang GG, Abraham RT. Phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) at Ser-2448 is mediated by p70S6 kinase. *J Biol Chem* 2005 Jul 8;280(27):25485-90.
- (89) Dufner A, Thomas G. Ribosomal S6 kinase signaling and the control of translation. *Exp Cell Res* 1999 Nov 25;253(1):100-9.
- (90) Zhu H, Zhang G, Wang Y, Xu N, He S, Zhang W, et al. Inhibition of ErbB2 by Herceptin reduces survivin expression via the ErbB2-beta-catenin/TCF4-survivin pathway in ErbB2-overexpressed breast cancer cells. *Cancer Sci* 2010 May;101(5):1156-62.
- (91) Quesnelle KM, Boehm AL, Grandis JR. STAT-mediated EGFR signaling in cancer. *J Cell Biochem* 2007 Oct 1;102(2):311-9.
- (92) Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene* 2007 May 14;26(22):3100-12.
- (93) Pommier Y, Weinstein JN, Aladjem MI, Kohn KW. Chk2 molecular interaction map and rationale for Chk2 inhibitors. *Clin Cancer Res* 2006 May 1;12(9):2657-61.

- (94) Diermeier-Daucher S, Clarke ST, Hill D, Vollmann-Zwerenz A, Bradford JA, Brockhoff G. Cell type specific applicability of 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) for dynamic proliferation assessment in flow cytometry. *Cytometry A* 2009 Jun;75(6):535-46.
- (95) Larrea MD, Liang J, Da ST, Hong F, Shao SH, Han K, et al. Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4. *Mol Cell Biol* 2008 Oct;28(20):6462-72.
- (96) Flaherty KT, Puzanov I. Building on a foundation of VEGF and mTOR targeted agents in renal cell carcinoma. *Biochem Pharmacol* 2010 Sep 1;80(5):638-46.
- (97) Vollmann-Zwerenz A, Diermeier-Daucher S, Wege AK, Sassen A, Schmidt-Brucken E, Hofstaedter F, et al. Multichromatic phenotyping of HER receptor coexpression in breast tumor tissue samples using flow cytometry - possibilities and limitations. *Cytometry A* 2010 Apr;77(4):387-98.
- (98) Hollmen M, Maatta JA, Bald L, Sliwkowski MX, Elenius K. Suppression of breast cancer cell growth by a monoclonal antibody targeting cleavable ErbB4 isoforms. *Oncogene* 2009 Mar 12;28(10):1309-19.
- (99) Prickett TD, Agrawal NS, Wei X, Yates KE, Lin JC, Wunderlich JR, et al. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4. *Nat Genet* 2009 Oct;41(10):1127-32.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Gero Brockhoff für die Möglichkeit, diese Promotionsarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen zu können. Bedanken möchte ich mich ebenfalls für die interessante Themenstellung, die hervorragende Betreuung, die prompte Antwort bei jeder Art von Fragen und die zahlreichen hilfreichen Diskussionen mit richtungsweisenden Ratschlägen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich ebenso bei Frau Dr. rer. nat. Simone Diermeier-Daucher für ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und ihre besonders kollegiale Unterstützung bei der Durchführung der Experimente und dem Verfassen dieser Arbeit. Ihr Einsatz und die vielen fruchtbaren Gespräche haben mir stets sehr viel weitergeholfen.

Mein Dank gilt außerdem Frau Elisabeth Schmidt-Brücken für ihre hervorragende Anleitung und überaus qualifizierte Hilfestellung in der Zellkultur sowie am Durchflusszytometer. Die angenehme Zusammenarbeit mit ihr hat mir die Durchführung von vielen Experimenten sehr erleichtert.

Weiterhin möchte ich Frau Marietta Bock ganz herzlich für die geduldige und sehr qualifizierte Einweisung in die SDS-PAGE und Western Blot Technik danken. Ihre stetige Hilfsbereitschaft und ihre kompetenten Ratschläge haben mir bei so manchem Problem weitergeholfen.

Bedanken möchte ich mich ebenso bei Frau Rosi Kromas für ihre ständige Hilfsbereitschaft und Unterstützung in der Zellkultur.

Weiterhin gilt mein Dank allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Brockhoff für die freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre, die ich während meiner gesamten Arbeit genießen konnte.